

Phänotypische Charakterisierung des Membran-assoziierten Virulenzfaktors Mip von *Legionella pneumophila*

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig



zur Erlangung des Grades
einer Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Janine Rasch
aus Braunschweig

1. Referent: Prof. Dr. Michael Steinert

2. Referentin: Prof. Dr. Susanne Häußler

eingereicht am: 28.09.2015

mündliche Prüfung (Disputation) am: 15.01.16

Druckjahr 2016

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Rasch J., Krüger S., Fontvielle D., Michel R., Ünal C.M., Labrosse A., Steinert M.
Association of *Legionella*-protozoa-nematode interactions in aquatic biofilms and influence of Mip on *Caenorhabditis elegans* colonization. (In preparation)

Rasch J.*, Theuerkorn M.*, Ünal C.M., Heinsohn N., Tran S., Fischer G., Weiwad M., Steinert M. Novel cycloheximide derivatives targeting the moonlighting protein Mip exhibit specific antimicrobial activity against *Legionella pneumophila*. Front. Bioeng. Biotechnol. Mar 27;3:41 (2015)
(*:equal contributions)

Rasch J., Ünal C.M., Steinert M. Peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerases of *Legionella pneumophila*: virulence, moonlighting and novel therapeutic targets. Biochem. Soc. Trans. Dec;42(6):1728-33 (2014)

Shevchuk O., Pägelow D., **Rasch J.**, Döhrmann S., Günther G., Hoppe J., Ünal C.M., Bronietzki M., Gutierrez MG., Steinert M. Polyketide synthase (PKS) reduces fusion of *Legionella pneumophila*-containing vacuoles with lysosomes and contributes to bacterial competitiveness during infection. Int. J. Med. Microbiol. Nov;304(8):1169-81 (2014)

Jäger J., Marwitz S., Tiefenau J., **Rasch J.**, Shevchuk O., Kugler C., Goldmann T., Steinert M. Human lung tissue explants reveal novel interactions during *Legionella pneumophila* infections. Infect. Immun. Jan;82(1):275-85 (2014)

Tagungsbeiträge

Rasch J., Heinsohn N., Klages A., Tran S., Hoppe J., Ünal C.M., Fuchs S., Zühlke D., Bonn F., Riedel K., Steinert M. Influence of the virulence factor Mip on the secretome profile of *Legionella pneumophila*. (Vortrag) 66. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM). Dresden (2014)

Rasch J., Lesnik R., Bronietzki M. A bacteria's journey to the centre of the host – from its environment into the cell 5. Public Retreat der Helmholtz International Graduate School for Infection Research, Goslar (2014)

Posterbeiträge

Rasch J., Krüger S., Hoppe J., Fuchs S., Zühlke D., Bonn F., Riedel K., Steinert M. Influence of the virulence factor Mip on the secretome profile of *Legionella pneumophila*. 65. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM). Rostock (2013)

Rasch J., Steinert M. New insights into *Legionella pneumophila* virulence factor Mip. 6. PhD-Symposium des Helmholtz-Zentrums für Infektionsforschung, Braunschweig (2012)

Rasch J., Steinert M. New insights into *Legionella pneumophila* virulence factor Mip. 64. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM). Hamburg (2012)

Rasch J., Steinert M. New insights into *Legionella pneumophila* virulence factor Mip. 3. Public Retreat der Helmholtz International Graduate School for Infection Research, Bad Bevensen (2012)

Rasch J., Hoppe J., Shevchuk O., Gutierrez M., Steinert M. Analysis of surface-associated virulence factors of *Legionella pneumophila*, 5. PhD Symposium des Helmholtz-Zentrums für Infektionsforschung, Braunschweig (2011)

*Ein guter Anfang braucht Begeisterung,
ein gutes Ende Disziplin.*

Prof. Dr. Hans-Jürgen Quadbeck-Seeger

Danksagungen

Bei **Prof. Dr. Michael Steinert** möchte ich ganz herzlich für das spannende Thema, die wissenschaftliche Freiheit und seinen grenzenlosen Optimismus während meiner Doktorarbeit danken. Danke für die stetige Unterstützung und Ermutigung.

Prof. Dr. Susanne Häußler und **Prof. Dr. André Fleißner** möchte ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens und des Prüfungsvorsitzes danken.

Bei **Dr. Torsten Goldmann** und **Dr. Sebastian Marwitz** vom Forschungszentrum Borstel bedanke ich mich für die freundschaftliche und erfolgreiche Zusammenarbeit im Bereich HLTE-Infektionen.

Dr. Matthias Richter, **Dr. Johannes Haag** und **Prof. Dr. Nikolaus Gaßler** vom Städtischen Klinikum Braunschweig möchte ich für die Bereitstellung von Lungengewebe danken.

Bei meinen Kooperationspartnern von der Universität Greifswald **Prof. Dr. Katharina Riedel**, **Dr. Stephan Fuchs**, **Dr. Daniela Zühlke** und **Florian Bonn** bedanke ich mich für die Gastfreundschaft während unseres Forschungsaufenthalts und für die Analyse der Sekretome.

Prof. Dr. Ralf Schnabel und **Cathrin Struck** danke ich für die kompetente Beratung und die Bereitstellung von *C. elegans*.

Prof. Dr. Dominique Fontvieille und **Mademoiselle Aurelie Labrosse** von der Université de Savoie danke ich für die Bereitstellung der Biofilmproben.

Meinen Bachelor-Studenten **Stefan Tran**, **Natascha Heinsohn** und **Alina Klages** danke ich für eine tolle Zusammenarbeit, unermüdlichen Einsatz, Freude an der Forschung und die schöne gemeinsame Zeit.

Meiner Praktikantin, Masterstudentin, Hilfwissenschaftlerin, Labornachbarin und jahrelangen Freundin **Stefanie Krüger** danke ich ganz herzlich für die schöne Zeit, die wir zusammen innerhalb und außerhalb des Labors verbracht haben. Danke für die begeisterte Mitarbeit an meinem Thema, für Aufmunterungen, Ratschläge, viele lustige Stunden und eine tolle Freundschaft.

Jens Jäger, meinem jahrelangen Labornachbarn, danke ich für viele witzige Stunden, absurde Gespräche und die Zusammenarbeit beim Außeneinsatz in der Weltmetropole Boston...äh Borstel. Von dir konnte ich eine Menge lernen.

Julia Hoppe, Dir danke ich für den Beistand bei unserem abenteuerlichen Aufenthalt in Greifswald. Nie werde ich vergessen, wie wir mit den blauen Säcken beladen vor dem Ernst-Thälmann-Ring standen.

Hannes Beims (dem Bienenmann) möchte ich für die Hilfe mit dem Programm „R“, für viele lustige und absurde Gespräche, für gemütliche Runden, für schöne Cuxhaven-Urlaube und für eine tolle Freundschaft danken.

Can Ünal (Drünibert), danke für das Korrekturlesen meiner Arbeit, die unermüdlichen Diskussionen über mein Projekt, die stetige Unterstützung, die erfolgreiche Zusammenarbeit, schöne Kochabende und für eine tolle Freundschaft.

Hilger (Sylvia) Jagau danke ich dafür, dass er alle Bienen töten möchte und vor allem für sein handwerkliches Geschick und seine stetige Hilfsbereitschaft.

Ich danke **Dennis Pägelow**, **Simon Döhrmann** und **Marc Bronietzki** für die schöne gemeinsame Zeit in der AG und auch für die Freundschaft über die Zeit hinaus.

Ein großes Dankeschön gilt der gesamten **AG Steinert** und dem Institut für Mikrobiologie für die familiäre Arbeitsatmosphäre, die Hilfsbereitschaft und die vielen lustigen Unternehmungen. Insbesondere möchte ich mich bei **Gabi, Daniela, Elena, Simone, Jessica, Freddi, Jana, Chris, Annemarie, Barbara** und **Qunxiu** für die gegenseitige Motivation und die schöne Zeit miteinander bedanken.

Ich danke meinen herzallerliebsten Freunden **Alex, Bassi, Ingo, Jenny, Jutta, Linda, Nancy, Martin, Matze, Michi, Mirko, Sabrina, Sebastian** und **Steffi** für einen tollen Zusammenhalt, die vielen legendären Momente, die schönen Urlaube und die ständige Unterstützung, auch in schlechten Zeiten. Ihr begleitet mich schon fast mein ganzes Leben lang und seid die besten Freunde, die man sich vorstellen kann.

Das Beste kommt bekanntlich zum Schluss: ganz besonders möchte ich mich bei meinem Mann **Sebastian, Mama, Papa** und meiner Schwester **Yvonne** für die stetige Unterstützung und Motivation bedanken. Ihr seid die beste Familie, die man sich wünschen kann.

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	SUMMARY	3
3	EINLEITUNG	5
3.1	LEGIONELLOSE	5
3.2	<i>LEGIONELLA PNEUMOPHILA</i> – ALLGEMEINE MERKMALE	6
3.3	LEBENSRAUM	7
3.4	INTRAZELLULÄRER LEBENSZYKLUS VON <i>L. PNEUMOPHILA</i>	9
3.5	WIRTSSYSTEME FÜR <i>L. PNEUMOPHILA</i>	12
3.5.1	DAS WIRTSSYSTEM <i>CAENORHABDITIS ELEGANS</i>	13
3.5.2	HUMANES, EXPLANTIERTES LUNGENGeweBE	15
3.6	VIRULENZFAKTOREN	15
3.6.1	PEPTIDYLPROLYL <i>CIS/TRANS</i> ISOMERASEN	19
3.6.1.1	Die Peptidylprolyl <i>cis/trans</i> Isomerase PpiB	21
3.6.1.2	Die Peptidylprolyl <i>cis/trans</i> Isomerase Mip	22
3.7	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	27
4	MATERIAL UND METHODEN	28
4.1	GERÄTE	28
4.2	VERBRAUCHSMATERIALIEN	29
4.3	ZELLEN, BAKTERIENSTÄMME, VEKTOREN, PRIMER UND ENZYME	30
4.4	BAKTERIOLOGISCHE METHODEN	39
4.4.1	KULTUR VON BAKTERIEN	39
4.4.2	KRYOKONSERVIERUNG VON BAKTERIEN	40
4.4.3	HERSTELLUNG KOMPETENTER <i>E. COLI</i> -ZELLEN	41
4.5	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	42
4.5.1	KULTIVIERUNG VON <i>ACANTHAMOEBA CASTELLANII</i>	42
4.5.1.1	Anzucht von <i>A. castellanii</i>	42
4.5.1.2	Kryokonservierung von <i>A. castellanii</i>	43
4.5.2	KULTIVIERUNG VON <i>DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM</i>	43
4.5.2.1	Anzucht von <i>D. discoideum</i>	43
4.5.2.2	Kryokonservierung <i>D. discoideum</i>	44

4.5.3	KULTIVIERUNG VON THP-1 MAKROPHAGEN	45
4.5.3.1	Anzucht von THP-1 Zellen	45
4.5.3.2	Kryokonservierung von THP-1 Zellen.....	45
4.5.3.3	Ausdifferenzieren von THP-1 Zellen.....	46
4.5.3.4	Zytotoxizitätsassay.....	46
4.6	INFEKTIONS BIOLOGISCHE METHODEN.....	47
4.6.1	INFEKTIONEN IN <i>A. CASTELLANII</i>	47
4.6.2	KOLOKALISATIONSSTUDIEN IN <i>D. DISCOIDEUM</i>	48
4.6.3	INFEKTIONEN IN THP-1 MAKROPHAGEN.....	49
4.6.4	INFEKTIONEN IN HLTES	50
4.6.5	<i>CAENORHABDITIS ELEGANS</i>	52
4.6.5.1	Anzucht von <i>C. elegans</i>	52
4.6.5.2	Quantifizierung der <i>C. elegans</i> -Kolonisierung durch Legionellen	52
4.6.6	SURVIVAL-ASSAYS IN <i>C. ELEGANS</i>	53
4.6.7	TROJAN-HORSE-INFEKTION.....	54
4.6.8	INFEKTION VON NATÜRLICHEN BIOFILMEN.....	55
4.7	MIKROBIOLOGISCHE METHODEN	55
4.7.1	SLIDING MOTILITY.....	55
4.7.2	TEMPERATURWACHSTUM.....	56
4.7.3	MINIMALE HEMMKONZENTRATION.....	57
4.8	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	57
4.8.1	ISOLATION DER GENOMISCHEN DNA	57
4.8.2	HERSTELLUNG VON <i>L. PNEUMOPHILA</i> DELETIONS KONSTRUKTEN	58
4.8.3	TRANSFORMATION VON CHEMISCH KOMPETENTEN <i>E. COLI</i> -ZELLEN.....	61
4.8.4	HERSTELLUNG VON <i>L. PNEUMOPHILA</i> DELETIONSMUTANTEN	62
4.8.5	KOMPLEMENTATION VON <i>L. PNEUMOPHILA</i> DELETIONSMUTANTEN	63
4.8.6	TRANSFORMATION VON <i>L. PNEUMOPHILA</i> MITTELS ELEKTROPORATION	64
4.8.7	KLONIERUNG VON <i>LEGIONELLA</i> -GENEN FÜR DIE REKOMBINANTE PRODUKTION	65
4.9	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN.....	67
4.9.1	KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON PROTEINEN	67
4.9.2	AUFKONZENTRATION VON PROTEINEN DURCH TCA-FÄLLUNG	67
4.9.3	AUFKONZENTRATION VON PROTEINEN MIT DEM AMICON®-SYSTEM	68
4.9.4	SDS-GELELEKTROPHORESE	68
4.9.5	WESTERN BLOT IM SEMI-DRY-VERFAHREN UND IMMUNFÄRBUNG	70
4.9.6	SHAVING VON OBERFLÄCHENPROTEINEN	71
4.9.6.1	Isolierung von Proteinen der äußeren Membran mit Na ₂ CO ₃	71
4.9.6.2	Isolierung von Proteinen der äußeren Membran mit Harnstoff	71
4.9.6.3	Isolierung von Proteinen der äußeren Membran mit Triton X-100.....	72
4.9.6.4	von Proteinen der äußeren Membran mit 0,05 M NaAc-HCl	72
4.9.7	PROTEINEXPRESSION IN <i>E. COLI</i>	72
4.9.8	SÄULENCHROMATOGRAPHIE	73

4.9.9	2D-GELELEKTROPHORESE.....	73
4.9.10	IDENTIFIKATION VON PROTEINEN VIA ORBITRAP	78
4.9.11	IDENTIFIKATION VON PROTEINEN VIA SYNAPT	79
5	ERGEBNISSE	81
5.1	SEKRETIONSSTUDIEN ZUM <i>L. PNEUMOPHILA</i> MIP-PROTEIN	81
5.1.1	MIP WIRD ÜBER DAS TYP-II-SEKRETIONSSYSTEM SEZERNIERT	81
5.2	KO-LOKALISATIONSSTUDIEN VON LCVs MIT LYSOSOMEN IN <i>D. DISCOIDEUM</i>.....	84
5.2.1	MIP SPIELT EINE ROLLE BEI DER VERHINDERUNG DER PHAGOLYSO-SOMALEN FUSION IN <i>D. DISCOIDEUM</i>	84
5.3	INFEKTIONEN VON HLTEs MIT EINER MIP-NEGATIVEN MUTANTE.....	86
5.3.1	MIP-DEFIZIENTE LEGIONELLEN LOKALISIEREN VERMEHRT IN MAKROPHAGEN	86
5.3.2	INFEKTION MIT <i>MIP</i> -DELETIONSMUTANTE HAT VERRINGERTEN GEWEBESCHADEN ZUR FOLGE	87
5.3.2.1	Mip beeinflusst die intrazelluläre Replikation in HLTEs	90
5.4	ANALYSE DES MIP-ABHÄNGIGEN SEKRETOMS.....	91
5.4.1	<i>LEGIONELLA</i> -SEKRETOME KÖNNEN DIE EFFIZIENTE REPLIKATION DER <i>MIP</i> -DELETIONSMUTANTE IN MAKROPHAGEN KOMPLEMENTIEREN	91
5.4.2	DIE <i>MIP</i> -DELETIONSMUTANTE SEZERNIERT MEHR PROTEINE ALS DER WILDTYP	93
5.4.3	DAS SEKRETOM DER <i>MIP</i> -DELETIONSMUTANTE WEIST ZAHLREICHE AKKUMULIERTE PROTEINE AUF	97
5.4.4	ANALYSE DES MIP-ABHÄNGIG SEZERNIERTEN HYPOTHETISCHEN PROTEINS LpC_080199	
5.4.4.1	Herstellung der <i>lpC_0801</i> -Deletionsmutante.....	100
5.4.4.2	Komplementation der <i>lpC_0801</i> -Deletionsmutante.....	101
5.4.4.3	LpC_0801 hat keinen Effekt auf die intrazelluläre Replikation in <i>A. castellanii</i>	102
5.4.4.4	LpC_0801 hat keinen Effekt auf die intrazelluläre Replikation in Makrophagen	105
5.4.4.5	LpC_0801 hat keinen Effekt auf die intrazelluläre Replikation in HLTEs.....	106
5.4.5	ANALYSE DES MIP-ABHÄNGIG SEZERNIERTEN HYPOTHETISCHEN PROTEINS LpC_2560...	
	108
5.4.5.1	Herstellung der <i>lpC_2560</i> -Deletionsmutante.....	108
5.4.6	KOMPLEMENTATION DER <i>LPC_2560</i> -DELETIONSMUTANTE.....	109
5.4.6.1	LpC_2560 beeinflusst die intrazelluläre Replikation in <i>A. castellanii</i>	111
5.4.6.2	LpC_2560 beeinflusst die intrazelluläre Replikation in Makrophagen.....	113
5.4.6.3	LpC_2560 beeinflusst die intrazelluläre Replikation in HLTEs	115
5.4.6.4	Die Isolation von rekombinantem LpC_2560.....	117
5.5	ANALYSE DER INTERAKTION ZWISCHEN DEN PPIASEN MIP UND PPIB IN BEZUG AUF VIRULENZ UND PHYSIOLOGIE	121
5.5.1	HERSTELLUNG DER <i>PPIB</i> -DELETIONSMUTANTE UND EINER Δ <i>MIP</i> Δ <i>PPIB</i> -DOPPELMUTANTE	121
5.5.1.1	Komplementation der <i>ppiB</i> -Deletionsmutante.....	124

5.5.2	MIP UND PPIB SIND WICHTIG FÜR DAS WACHSTUM VON <i>L. PNEUMOPHILA</i> BEI EXTREMEN TEMPERATUREN	125
5.5.3	MIP UND PPIB SPIELEN EINE ROLLE BEI DER SLIDING MOTILITY VON <i>L. PNEUMOPHILA</i>	128
5.5.3.1	Die PPIase-Doppelmutante zeigt eine geringere intrazelluläre Replikation in <i>A. castellanii</i> als Δmip	132
5.5.3.2	PpiB beeinflusst die intrazelluläre Replikation in Makrophagen	134
5.5.4	LEGIONELLA-SEKRETOME KÖNNEN DIE EFFIZIENTE REPLIKATION DER PPIASE-MUTANTEN IN MAKROPHAGEN KOMPLEMENTIEREN	136
5.5.4.1	PpiB beeinflusst die intrazelluläre Replikation in HLTEs	139
5.5.5	DIE PPIASE-MUTANTEN HABEN EIN UNTERSCHIEDLICHES SEKRETOM-PROFIL	141
5.5.6	DAS SEKRETOM DER MIP-DELETIONSMUTANTE LÖST KEINEN GEWEBESCHADEN IN HLTEs AUS	144
5.5.6.1	Die Isolation von rekombinantem PpiB	146
5.6	EINFLUSS VON NEUEN CYCLOHEXIMID-DERIVATEN AUF DAS WACHSTUM VON LEGIONELLEN	147
5.6.1	NEUE IMID-SUBSTITUIERTE CYCLOHEXIMIDDERIVATE HABEN EINE STARKE FKBP-INHIBIERENDE WIRKUNG	147
5.6.2	CYCLOHEXIMID-DERIVATE HABEN EINE INHIBITORISCHE WIRKUNG AUF DAS WACHSTUM VON <i>L. PNEUMOPHILA</i>	149
5.6.3	CYCLOHEXIMID-DERIVATE MIT ADAMANTYL-SUBSTITUIERUNG INHIBIEREN DIE INTRAZELLULÄRE REPLIKATION VON <i>L. PNEUMOPHILA</i>	150
5.7	ANALYSE DER INTERAKTION ZWISCHEN NEMATODEN UND LEGIONELLEN	152
5.7.1	LEGIONELLEN BESIEDELN AMÖBEN UND NEMATODEN AUS NATÜRLICHEN BIOFILMEN	152
5.7.2	LEGIONELLEN, AMÖBEN UND NEMATODEN INTERAGIEREN MITEINANDER	155
5.7.3	MIP BEEINFLUSST DAS ÜBERLEBEN VON <i>C. ELEGANS</i> WÄHREND DER BESIEDLUNG DURCH LEGIONELLEN	157
5.7.4	MIP FÖRdert DIE BESIEDLUNG VON <i>C. ELEGANS</i> DURCH LEGIONELLEN	159
6	DISKUSSION	161
6.1	MIP ALS INDIREKTER VIRULENZFAKTOR	161
6.1.1	MIP BEEINFLUSST PROTEINE DES SEKRETOMS, DIE FÜR DIE REPLIKATION UND VERBREITUNG IN HUMANEM LUNGENGeweBE WICHTIG SIND	161
6.1.2	MIP BEEINFLUSST DAS SEKRETOM VON <i>L. PNEUMOPHILA</i>	164
6.1.3	LPC_2560 IST EIN NEUER MIP-ABHÄNGIGER VIRULENZFAKTOR VON <i>L. PNEUMOPHILA</i>	167

6.2	PPIASEN SIND WICHTIG FÜR TEMPERATURWACHSTUM, MOTILITÄT UND INTRAZELLULÄRE REPLIKATION UND KOMPENSIEREN SICH GEGENSEITIG	172
6.3	CYCLOHEXIMID-DERIVATE HABEN EINE BIOLOGISCHE AKTIVITÄT GEGEN <i>L. PNEUMOPHILA</i>	178
6.4	<i>L. PNEUMOPHILA</i> UND DIE EVOLUTIONÄRE ANPASSUNG AN METAZOEN.....	182
6.5	AUSBLICK	187
7	LITERATURVERZEICHNIS	188
8	ANHANG	204
8.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	204
8.2	TABELLEN DER SEKRETOMANALYSE	206
8.3	ALIGNMENT DER DOPPELMUTANTE <i>ΔMIPΔPPIB</i>	211
8.4	INTERNETQUELLEN	214

1 Zusammenfassung

Legionella pneumophila ist ein fakultativ intrazelluläres Bakterium, das ubiquitär in der Umwelt vorkommt und sich in Protozoen repliziert. Wegen der Ähnlichkeiten auf zellulärer Ebene ist das Bakterium ebenso in der Lage sich in humanen Makrophagen zu vermehren. Deshalb können Legionellen den Menschen als Wirt besiedeln. Die Ausbreitung der Legionellen in der menschlichen Lunge hat eine Schädigung des Gewebes und oft den Ausbruch der Legionärskrankheit, einer atypischen Lungenentzündung, mit einer Letalität von 15-20 % zur Folge.

Der Virulenzfaktor Mip hat eine Kollagen IV-Bindestelle und ist wichtig für die intrazelluläre Replikation der Legionellen in Makrophagen und Amöben. Außerdem sind Mip-defiziente Stämme attenuiert in der Meerschweinchen-Infektion. Als einzige Funktion dieses Proteins wurde eine Peptidylprolyl *cis/trans* Isomeraseaktivität (PPIase) identifiziert, ein natürliches Substrat wurde aber bisher nicht gefunden. Trotz Identifizierung einiger Phänotypen blieb die genaue Rolle von Mip in der Infektion bis dato ungeklärt.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden zunächst neue Mip-abhängige Phänotypen in *L. pneumophila* aufgedeckt, um die Funktion des Proteins als Virulenzfaktor zu entschlüsseln. Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Einfluss von neuartigen Cycloheximid-Derivaten auf das Wachstum und die Mip-abhängige Replikation von *L. pneumophila* untersucht. Im dritten Teil der Arbeit wurde die Relevanz von Mip für die Verbreitung von Legionellen in der Umwelt analysiert.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Relevanz von Mip für die Vermehrung und die Verbreitung in humanem, explantiertem Lungengewebe (HLTE) gezeigt werden. Die Infektion von HLTEs mit der *mip*-Deletionsmutante verursachte nur einen geringen Gewebeschaden, rekombinantes Mip alleine war aber nicht in der Lage, die Gewebearchitektur zu schädigen. Deshalb wurde angenommen, dass Mip in der Lage ist, andere Proteine zu beeinflussen. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde das Mip-abhängige Sekretom analysiert. Im zellfreien Kulturüberstand der *mip*-Deletionsmutante lagen viele Proteine akkumuliert vor. Zwei davon, LpC_0801 und LpC_2560 (Mrf), wurden im Rahmen dieser Arbeit näher charakterisiert. Die Deletion von LpC_0801 hatte keinen Einfluss auf die Virulenz der Bakterien. Im Gegensatz dazu

konnte LpC_2560 (Mrf) als neuer Mip-abhängiger Virulenzfaktor charakterisiert werden. Der Mrf-negative Stamm zeigte eine verminderte intrazelluläre Replikation in *Acanthamoeba castellanii*, THP-1 Makrophagen und HLTEs. Mip scheint also unter anderem eine Rolle bei der Aktivierung von Virulenzfaktoren zu spielen.

Das Mip-Protein ist eine der sechs annotierten PPIasen in *L. pneumophila*. Um eine mögliche Kompensation zwischen den Aktivitäten von *Legionella*-PPIasen zu untersuchen, wurde das Cyclophilin PpiB als potenziell Virulenz-assoziierte PPIase für eine weitere Charakterisierung ausgewählt. Deletionsmutanten beider PPIasen hatten ein vermindertes Wachstum bei niedrigen und hohen Temperaturen. Außerdem wiesen sie eine verminderte Sliding Motility und intrazelluläre Replikation in *A. castellanii*, Makrophagen und HLTEs auf. Somit spielen Mip und PpiB eine Rolle für das Wachstum bei extremen Temperaturen, der Sliding Motility und der intrazelluläre Replikation. Eine doppelte Deletionsmutante zeigte sogar oft einen verstärkten Phänotyp, was auf eine Kompensation der PPIase-Aktivität der beiden Proteine untereinander schließen lässt.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden neuartige Cycloheximid-Derivate getestet, die in der Lage waren die PPIase-Aktivität bereits im nanomolaren Bereich zu inhibieren. Einige Substanzen hatten einen inhibitorischen Effekt auf das Wachstum und intrazelluläre Replikation von *L. pneumophila*, dieser war allerdings Mip-unabhängig.

Im dritten Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach einer Inokulation eines natürlichen Biofilms mit markierten Legionellen, die Protozoen *Oxytricha bifaria*, *Ciliophrya sp.* und *Stylonychia mytilus* und der Darm einer aquatischen Nematodenspezies von den Bakterien besiedelt wurden. Um die entdeckte Interaktion zwischen Nematoden und Legionellen näher zu analysieren, wurde die Relevanz von Mip für die Besiedlung des Verdauungstraktes von *Caenorhabditis elegans* charakterisiert. Die durchgeführte Überlebenszeitanalyse ergab, dass Nematoden, die mit Mip-negativen Legionellen kultiviert wurden, einen verzögerten Median der Letalität aufwiesen. Die Quantifizierung der inraintestinalen Bakterien während des Infektionsverlaufs ergab, dass die Anzahl der Mip-negativen Legionellen im Vergleich zum Wildtyp geringer war. Dies lässt vermuten, dass das Mip-Protein eine Rolle bei der Adhäsion von Mip an das Kollagen des Nematodendarms spielt, was wiederum die Besiedlung verschiedener Metazoen fördern kann.

2 Summary

Legionella pneumophila is an environmental bacterium, which replicates intracellularly within protozoa. As a result of conservation on cellular level it can also colonize the human lung, multiply in alveolar macrophages and destroy the lung tissue. The outcome of this is often the outbreak of Legionnaire's disease, an atypical pneumonia with a lethality of 15-20 %.

The virulence factor Mip has a collagen IV binding site and is important for the intracellular replication of *L. pneumophila* in macrophages and amoeba. Additionally, Mip-deficient strains are attenuated in guinea pig infection. The only identified function of this protein is a peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase activity (PPIase), but until now no natural substrate has been found. Despite the identification of several phenotypes the role of Mip during infection is still unclear.

In the first part of this thesis new Mip-dependent phenotypes of *L. pneumophila* were identified, to clarify the specific function of Mip as a virulence factor. In the second part, the influence of novel cycloheximid-derivatives on the growth and the Mip-dependent intracellular replication of *L. pneumophila* was analyzed. As a third topic, the relevance of Mip for the distribution in the environment was evaluated.

In context of this thesis the relevance of Mip for the multiplication and dissemination in human lung tissue explants (HLTEs) were investigated. The infection of HLTEs with the Mip-negative strain caused just a slight damage of the tissue, but recombinant Mip was not able to destroy the tissue architecture. Because of that, it was hypothesized that Mip can influence other secreted proteins. To prove this, the Mip-dependent secretome was analyzed using proteomics. In the cell free culture supernatant of the Mip-negative strain many proteins were found to be accumulated. Two of these, LpC_0801 and LpC_2560 (Mrf), were chosen for detailed analysis. Deletion of LpC_0801 had no effect on virulence properties of the bacteria. Mrf, on the other hand, could be identified as a novel Mip-dependent virulence factor. The Mrf-negative strain showed a reduced intracellular replication in *Acanthamoeba castellanii*, THP-1 macrophage cell line and HLTEs. Accordingly, Mip is involved in the activation of other virulence factors.

The Mip protein is one of the six annotated PPIases of *L. pneumophila*. To analyze a potential compensation between the activities of *Legionella*-PPIases, the cyclophilin PpiB was selected as a potentially virulence-relevant PPIase for further characterization.

Deletion mutants of both PPIases had a reduced growth at low and high temperatures. In addition, they also exhibited a reduced sliding motility and intracellular growth in *A. castellanii*, THP-1 macrophage cells and HLTEs. Hence, Mip and PpiB play a role for growth at extreme temperatures, sliding motility and intracellular replication. Actually, a double mutant strain exhibited a stronger phenotype in most cases, so that compensation between the activities of both PPIases can be reasoned.

In the second part of this thesis novel cycloheximid derivatives, which can inhibit the PPIase activity in a nanomolar scale, were analyzed. Some substances inhibited the growth and intracellular replication of *L. pneumophila*. However, this phenotype was not Mip-dependent.

In the third part of this thesis the relevance of Mip for the dissemination of *L. pneumophila* in the environment was analyzed. It was shown, that after inoculation of a natural biofilm with marked *L. pneumophila*, the protozoa *Oxytricha bifaria*, *Ciliophrya sp.* and *Stylonychia mytilus* and the intestine of an aquatic nematode species could be colonized by the bacteria. To analyze the observed interaction between nematodes and *L. pneumophila*, the relevance of Mip for the colonization of the intestinal tract of *Caenorhabditis elegans* was characterized. The conducted survival assay showed that nematodes, which were cultivated with the Mip-negative strain, had a delayed median of the mortality. The quantification of the inraintestinal bacteria during the course of infection revealed, that the amount of Mip-negative bacteria was reduced, compared to the wild type. This indicates that the Mip protein plays a role for the adhesion of Mip to the collagen of the intestine of nematodes, which results in improved colonization of metazoa.

3 Einleitung

Im Bellevue Stratford Hotel in Philadelphia fand im Juli 1976 ein Treffen der amerikanischen Kriegsveteranen (American Legion) statt. Von den 4400 Teilnehmern erkrankten 5 % an einer atypischen Lungenentzündung, deren Symptome bis dahin keinem bekannten Erreger zugeordnet werden konnten. Kurz darauf starben 15 % der Erkrankten. Ein halbes Jahr später isolierten Joseph McDade und Charles Shepard den unbekannten Erreger, der nach dem Ursprung seiner Entdeckung *Legionella pneumophila* genannt wurde (Fraser *et al.*, 1977; McDade *et al.*, 1977).

3.1 Legionellose

Durch die Inhalation von Aerosolen aus kontaminierten Systemen, können Legionellen in die menschliche Lunge gelangen und so eine Legionellose hervorrufen (Fraser *et al.* 1977). Seit 2001 ist die nachgewiesene, akute Infektion durch *Legionella sp.* nach § 7 Abs. 1 IfSG meldepflichtig. Aufgrund der grippeähnlichen Symptome, kommt es jedoch oft zu Fehldiagnosen, weshalb von einer Untererfassung ausgegangen wird. Legionellose kann sich auf zwei Arten ausprägen. Die milder verlaufende Form ist das Pontiac-Fieber, das mit grippeähnlichen Symptomen, wie Fieber sowie Kopf- und Muskelschmerzen verläuft. Es bildet sich keine Lungenentzündung aus und der Verlauf dieser Krankheit ist nicht tödlich. Die schwere Form einer Legionellose ist die Legionärskrankheit, eine atypische Pneumonie. Diese hat eine Inkubationszeit von zwei bis zehn Tagen und verläuft mit Symptomen wie Kopf- und Muskelschmerzen, hohem Fieber, Husten, Thorax-Schmerzen, Diarrhö und Verwirrtheit. Es kann sogar zu respiratorischer Insuffizienz und Nierenversagen kommen. Die Letalitätsrate liegt trotz Behandlung bei 15 bis 20 %. Therapiert wird Legionellose mit Antibiotika, wie Levofloxacin, die sich gut in Zellen anreichern können (Fraser *et al.*, 1977; RKI.de, 2013). Zur Risikogruppe gehören alte Menschen, Männer, Alkoholiker, Raucher und immungeschwächte Personen (Breiman und Butler, 1998). Eine Übertragung der Krankheit von Mensch zu Mensch wurde bislang nicht beobachtet (Steinert *et al.*, 2002).

Legionellose kommt weltweit meistens sporadisch, aber des Öfteren auch in größeren, lokalen Ausbrüchen vor. Aktuelle Beispiele sind der Legionellen-Ausbruch in New York im August 2015, mit ca. 120 Erkrankten (nytimes.com), der Ausbruch im November 2014 in Portugal mit 336 Erkrankten (Shivaji *et al.*, 2014) und der Ausbruch im August 2013 in Warstein, bei dem 159 Menschen erkrankt sind (RKI.de, 2013). Um die Gefahr der Erkrankung an einer Legionellose einzudämmen, wurde in Deutschland am 01.11.2011 eine Anzeige- und Untersuchungspflicht für große Trinkwasserinstallationen in die Trinkwasserverordnung (TrinkwV) aufgenommen. In öffentlichen Gebäuden muss der Legionellen-Gehalt im Wasser jährlich kontrolliert werden. Wird eine Konzentration von 100 Legionellen pro 100 ml überschritten, muss dies dem Gesundheitsamt gemeldet werden. Es folgen Desinfektionsmaßnahmen, die von thermischer, chemischer oder elektromagnetischer Natur sein können. Oft wird eine Kombination aus verschiedenen Verfahren gewählt (RKI.de, 2013; TrinkwV 2001). Um eine Kontamination mit Legionellen zu vermeiden, dürfen Anlagen gemäß DVGW W 551 an keiner Stelle im Verteilungssystem Wassertemperaturen unter 55 °C aufweisen.

3.2 *Legionella pneumophila* – allgemeine Merkmale

Legionella pneumophila ist ein Gram-negatives, aerobes Stäbchenbakterium, das monopolar begeißelt ist. Es hat einen Durchmesser von 0,3 bis 0,9 µm und eine Länge von 2 bis 20 µm (Diederens, 2008). Legionellen sind sehr temperaturstabil. Ihr Temperaturoptimum liegt bei 37 °C, wobei das Wachstum zwischen 25 °C und 45 °C möglich ist. Erst ab 55 °C beginnt die Hemmung des Wachstums und oberhalb von 60 °C kommt es zum Absterben der Bakterien (Barker und Till, 1986).

Wenn Legionellen über einen längeren Zeitraum hohem Stress, wie geringem Nährstoffangebot und extremen Temperaturen ausgesetzt sind, gehen sie in den *viable but not culturable* (VBNC) Status über (England *et al.*, 1982). In diesem Status sind sie zwar lebendig, aber nicht mehr auf Standardmedien wie BCYE-Agar zu kultivieren. Nur durch eine Ko-Kultivierung von VBNCs mit Amöben wie *Acanthamoeba castellanii* konnte bisher eine Rückführung in eine kultivierbare Form bewirkt werden (Steinert *et al.*, 1997).

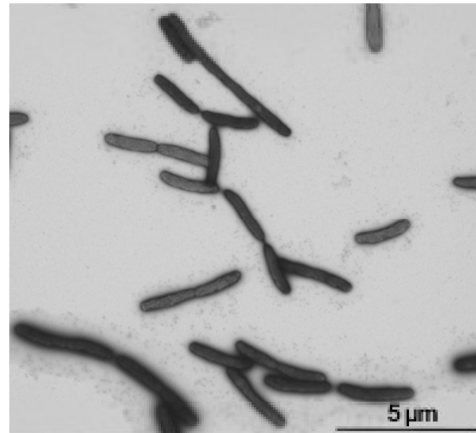


Abbildung 1. TEM-Aufnahme *Legionella pneumophila* Corby. In der Negativkontrastierung ist die stäbchenförmige Form der Zellen zu erkennen, Maßstab = 5 µm (Drawert, 2013).

Legionellen gehören zur Familie der Legionellaceae, die den γ -Proteobakterien untergeordnet ist. Das Genom ist 3,3 bis 3,5 Megabasen groß und hat einen GC-Gehalt von 38 %. Bislang sind 62 Arten und 79 Serogruppen bekannt (Cazalet *et al.*, 2004; RKI.de, 2013). Zur Gattung *Legionella* zählen auch die *Legionella like Amoebal Pathogens* (LLAP), da sie eine genomische Homologie aufweisen (Adeleke *et al.*, 1996; Adeleke *et al.*, 2001).

Alle Legionellen sind potenzielle Humanpathogene. Insgesamt sind jedoch etwa 90 % aller Legionellosen auf *L. pneumophila* zurückzuführen. Die Art *L. pneumophila* umfasst 16 Serogruppen. Die größte Bedeutung hat Serogruppe 1, die sich in 10 monoklonale Subtypen gliedern lässt (Yu *et al.*, 2002; Steinert *et al.*, 2007; Palusińska-Szyszk und Russa, 2009).

3.3 Lebensraum

Legionellen kommen ubiquitär in der Umwelt vor. Dort besiedeln sie vor allem aquatische und terrestrische Habitate und vermehren sich fakultativ intrazellulär in insgesamt 14 Spezies der Amöben (z.B. *Hartmanella vermiformis* und *Acanthamoeba castellanii*) und zwei Spezies der Ciliaten (Atlas, 1999; Molmeret *et al.*, 2005; Taylor *et al.*, 2009a). Bei niedrigen Temperaturen oder Umweltstress können sich Amöben zu Zysten differenzieren. Legionellen können sich innerhalb der Zysten nicht replizieren,

aber überleben. Der Vorteil dieses Entwicklungsstadiums ist die hohe Resistenz gegenüber Stressfaktoren, was auch die Bakterien vor chemischen und physischen Einflüssen schützt (Kilvington und Price, 1990; Abu Kwaik *et al.*, 1998; Ohno *et al.*, 2008).

Legionellen, die nach der Replikation aus freilebenden Amöben austreten, zeigen im Vergleich zu *in vitro* angezogenen Zellen eine erhöhte Resistenz gegenüber extremen Bedingungen. Sie haben eine veränderte Biochemie, Physiologie und sind verstärkt virulent (Abu Kwaik *et al.*, 1998). Diese Änderungen beinhalten eine verbesserte Resistenz gegenüber Chemikalien, ein verändertes Fettsäuren- und Proteinprofil, eine kleinere Zellgröße, Motilität, eine höhere Infektiosität gegenüber und stärkere Aufnahme durch Amöben und Säugerzellen und eine größere umweltbedingte Fitness (Cirillo *et al.*, 1994; Steinert *et al.*, 1997; Molmeret *et al.*, 2005; García *et al.*, 2007).

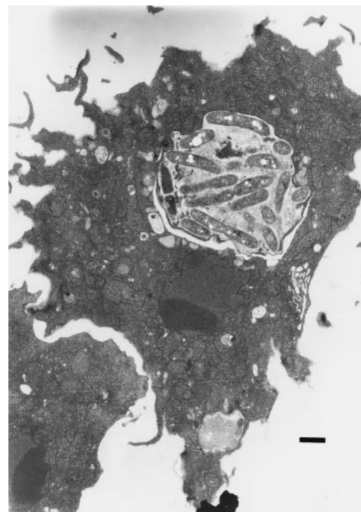


Abbildung 2. TEM-Aufnahme von mit *L. pneumophila* infizierten *D. discoideum*. *L. pneumophila* vermehrt sich intrazellulär in *D. discoideum*. Maßstabsbalken = 1 μ m (Hägele *et al.*, 2000).

Wichtig für die Adaptation an die Umwelt ist die Biofilmbesiedlung. Diese Eigenschaft schützt sie vor Stressfaktoren wie pH- und Temperatur-Schwankungen, Schadstoffen und Strahlung. Zusätzlich helfen Biofilme, Wirte für die intrazelluläre Vermehrung anzulocken, denn für freilebende Protozoen bieten sie eine attraktive Nahrungsquelle (Alleron *et al.*, 2008; Declerck, 2010). Die Besiedlung schützender Biofilme und die Resistenz gegenüber extremen Temperaturen ermöglichen es Legionellen sich in

sanitären Wassersystemen wie Klimaanlage, Wassertanks und Duschleitungen anzusiedeln. Wenn Wassersysteme lange Zeit nicht genutzt werden oder veraltet sind, kann es zur massenhaften Vermehrung der Bakterien in den Rohrleitungen kommen. Über Aerosole, die beispielsweise beim Duschen entstehen, können Legionellen durch Inhalation in die menschliche Lunge gelangen. Dort können sie sich in den alveolaren Makrophagen replizieren (Abb. 3) und beim Menschen eine Legionellose auslösen (Borella *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2010).

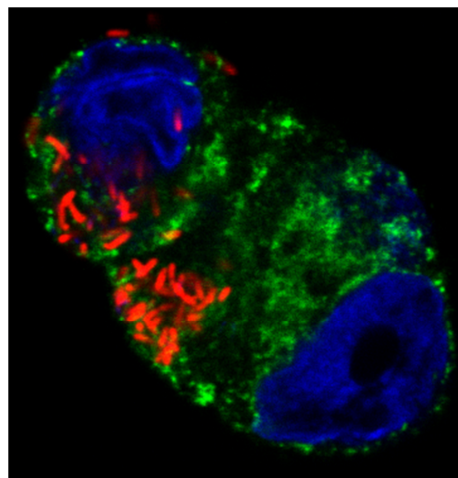


Abbildung 3. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von mit *L. pneumophila* infizierten THP-1 Makrophagen. Die Phagosomen enthalten *L. pneumophila* mCherry (rot). Diese Fusion mit den Lysosomen (grün; LAMP-1) wird verhindert und die Legionellen vermehren sich innerhalb der Zellen (blau: Zellkern, DAPI) (Diese Arbeit).

3.4 Intrazellulärer Lebenszyklus von *L. pneumophila*

Als fakultativ intrazelluläre Pathogene sind Legionellen für ihre Vermehrung auf Wirtszellen angewiesen (Abbildung 2) (Daisy *et al.*, 1981; Sanden *et al.*, 1992). Dafür haben sie Mechanismen entwickelt, die einen Abbau der Bakterien durch das Lysosom verhindern (Kagan und Roy, 2002; Newton *et al.*, 2010). In der Umwelt replizieren sie sich vorrangig in Amöben (Newsome *et al.*, 1985; Sanden *et al.*, 1992; Cirillo *et al.*, 1994). *L. pneumophila* adhäriert mit Hilfe von Typ IV-Pili an Oberflächenrezeptoren

von Amöben und Makrophagen (Stone und Abu Kwaik, 1998). Die Wirtszelle nimmt die Bakterienzellen über Phagozytose auf. In Makrophagen oder Monozyten ist diese Rezeptor-abhängig. Die Komplementfaktoren C3b und iC3b binden an das „Major outer membrane protein“ (MOMP) von *Legionella* und bilden einen Komplex, der wiederum an die Komplementfaktoren CR1 und CR3 der Wirtszelloberfläche bindet (Bellinger-Kawahara und Horwitz, 1990).

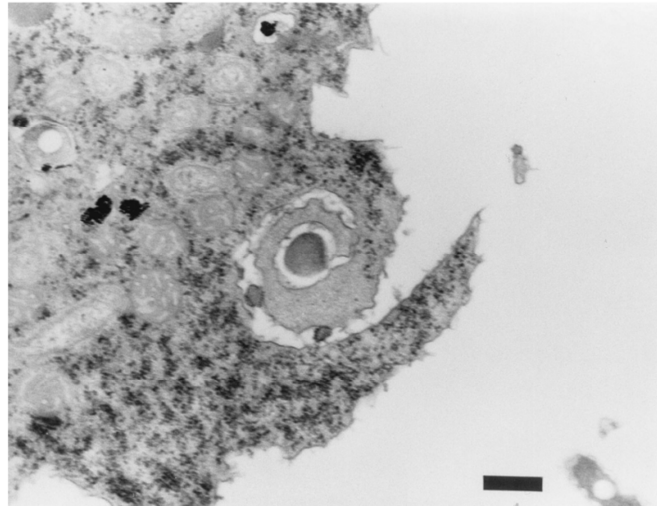


Abbildung 4: Legionellen können über die „coiling“ Phagozytose aufgenommen werden. Elektronenmikroskopische Aufnahme der „coiling“ Phagozytose von *L. pneumophila* durch *A. castellanii* (Bozue und Johnson, 1996).

Legionellen, die zuvor mit Antikörpern opsonisiert wurden, können über die Bindung an Fc-Rezeptoren phagozytiert werden (Husmann und Johnson, 1992). Außerdem ist eine Komplement- und Antikörper-unabhängige Aufnahme möglich. Dabei binden die auf der Bakterienoberfläche befindlichen Kohlenhydrat- oder Lipidstrukturen an die Wirtszelle (Rodgers und Gibson, 1993; Gibson *et al.*, 1994; Tachado *et al.*, 2008). Selten wurde als Aufnahmemechanismus die sogenannte „coiling“ Phagozytose beobachtet (Bozue und Johnson, 1996), bei der die Wirtszelle ein Pseudopodium ausbildet, welches das Bakterium umwickelt und anschließend internalisiert (Abb. 4).

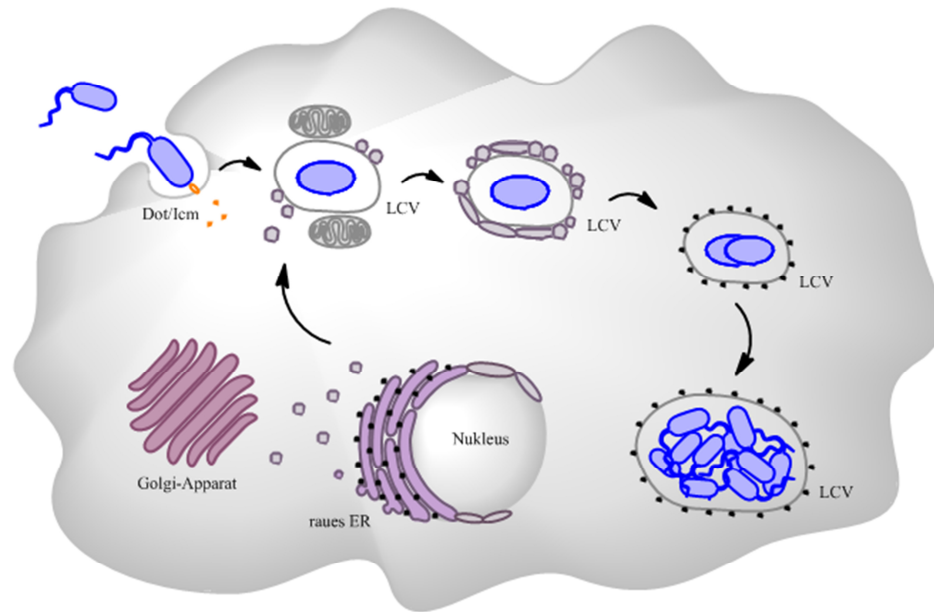


Abbildung 5: Intrazellulärer Lebenszyklus von Legionellen in Wirtszellen. Nach der Aufnahme durch eine Wirtszelle befinden sich die Bakterien in einem modifizierten Phagosom, „*Legionella* containing vacuole“ (LCV) genannt. Die Verschmelzung von Phagosom und Lysosom wird mit Hilfe des Dot/Icm-Systems verhindert. Gleichzeitig reift das Phagosom durch die Assoziation mit Mitochondrien und Vesikeln des rauen ERs. Die Legionellen vermehren sich, bis die Wirtszelle lysiert. Nach Freisetzung in die Umwelt befinden sich die Bakterien in einem hochvirulenten Zustand und können weitere Wirtszellen infizieren (Rasch, 2011).

Mit Hilfe des Dot/Icm Typ IV-Sekretionssystems (T4SS) wird in der Wirtszelle die Fusion von Phagosom und Lysosom unterbunden und somit eine Ansäuerung des Phagosoms verhindert. *Legionella*-Mutanten, die einen Defekt im T4SS aufweisen, werden in einer Wirtszelle nahezu komplett abgebaut (Hilbi *et al.*, 2001). Um eine replikative Nische etablieren zu können, werden Vesikel des rauen ERs, Mitochondrien und Ribosomen rekrutiert, die mit der Legionellen enthaltenden Vakuole, genannt „*Legionella* containing vacuole“ (LCV), assoziieren. Die Bakterien vermehren sich nun in der LCV, wobei der pH-Wert der Vakuole neutral bleibt (Wieland *et al.*, 2004).

Am Ende der Vermehrungsphase sind Legionellen hochvirulent. Dies ermöglicht es ihnen, einen neuen Wirt zu besiedeln. Dieses Stadium zeichnet sich durch Stressresistenz und Motilität aus (Molofsky und Swanson, 2004). Letztendlich werden die Legionellen durch nekrotische Lyse und Porenbildung freigesetzt (Kirby *et al.*, 1998).

3.5 Wirtssysteme für *L. pneumophila*

Für die Analyse von *L. pneumophila* stehen verschiedene Modellsysteme zur Verfügung. Neben den natürlichen Wirten wie *Acanthamoeba castellanii*, *Hartmanella vermiformis*, und *Dictyostelium discodeum*, (Rowbotham, 1980; Hägele *et al.*, 2000) werden auch monozelluläre humane Systeme, wie Makrophagen und Epithelzellen verwendet, um beispielsweise Infektionsstudien durchzuführen (Pearlman *et al.*, 1988; Mody *et al.*, 1993). Diese Systeme haben sich für die Identifikation von relevanten Virulenzfaktoren bewährt (Hacker *et al.*, 1993; Hoffmann *et al.*, 2014).

Für die Charakterisierung von immunologischen, pharmakologischen und pathologischen Fragestellungen wurden Tiermodelle, wie Meerschweinchen- und bestimmte Mauslinien etabliert (Baskerville *et al.*, 1981; Fitzgeorge und Dennis, 1983; Hori und Zamboni, 2013). Vor allem Meerschweinchen eignen sich als Modell, da diese besonders anfällig für die Infektion mit Legionellen sind. Die oft für andere Bakterien verwendeten Inzucht-Mauslinien kommen nicht als Wirt in Betracht, da sich *L. pneumophila* in diesem System nicht vermehren kann. Eine Ausnahme ist die A/J Mauslinie, bei der die Anfälligkeit für *Legionella*-Infektionen durch einen genetischen Polymorphismus im locus *lgn1* hervorgerufen wird. Diese Mutation liegt innerhalb des *birc1e/naip5* Gens, das für Naip5 aus der Nod-Like Rezeptor (NLR) Familie codiert. Dieses Protein ist in der Lage, bakterielles Flagellin im Zytosol der Wirtszelle zu erkennen. Daraufhin werden Nlrc4 und Caspase-1 von Naip5 rekrutiert, und durch Bildung des Inflammasoms, kann die Replikation von Bakterien verhindert werden. Entsprechend kann sich eine Flagellin-negative Mutante von *L. pneumophila* in A/J-Mäusen vermehren (McDade und Shepard, 1979; Berendt *et al.*, 1980; Brieland *et al.*, 1994; Beckers *et al.*, 1995; Wright *et al.*, 2003; Hori und Zamboni, 2013).

Als weitere Modellsysteme kommen Intervertebraten in Frage. Ein Modell ist die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, welche eine hohe Mortalität bei abdominalen Injektionen von *L. pneumophila* zeigt (Kubori *et al.*, 2010). Die phagozytischen Blutzellen der Larven von *Galleria mellonella* begünstigen die bakterielle Replikation der Legionellen, weshalb auch Wachsmotten zu den möglichen Wirten für Infektionsstudien zählen (Harding *et al.*, 2012).

3.5.1 Das Wirtssystem *Caenorhabditis elegans*

C. elegans ist ein Nematode aus der Familie der Rhabditidae und kommt freilebend im Kompost und in feuchten Böden vor. Optimale Wachstumsbedingungen hat der Wurm bei 15 – 25 °C und einer Sauerstoffkonzentration von 6 % (Riddle *et al.*, 1997; Blaxter, 1998). Der langgestreckte und unsegmentierte Körper von *C. elegans* ist von einer schützenden Cuticula umgeben und besteht aus einer flüssigkeitsgefüllten Leibeshöhle und Organen wie beispielsweise dem Verdauungstrakt. Dieser ist in Pharynx, Darm und After gegliedert und ist in der Lage die Funktion von Organen wie Leber und Niere zu übernehmen. Die Basalmembran des Darms besteht zu großen Teilen aus Collagen IV und Laminin. Umgeben ist der Wurm von einem Hartmuskelschlauch, durch den die Fortbewegung, Stabilität und der Gasaustausch gewährleistet sind (Poltz und Philipp, 1992; Graham *et al.*, 1997; Corsi, 2006). Der Fadenwurm kommt meist als Hermaphrodit und selten als Männchen vor und ist in der Lage durch Selbstbefruchtung bis zu 300 und durch Verpaarung bis zu 1000 Nachkommen zu erzeugen. Interessanterweise ist die Zellzahl der Würmer immer gleich, Hermaphroditen bestehen aus 959 und Männchen aus 1031 somatischen Zellen (Brenner, 1974; Riddle *et al.*, 1997; Gems und Riddle, 2000). In der Entwicklung durchläuft *C. elegans* verschiedene Stadien. Wenn ein Ei das 28-30-Zellstadium erreicht hat, wird es über die Vulva abgelegt. Nach Abschluss der Embryogenese durchläuft der Wurm die Larvenstadien 1-4 und entwickelt sich schließlich zum adulten Tier. Die vollständige Entwicklung dauert ca. 46 h. Ist die L1-Larve während der Entwicklung zum Larvenstadium 2 zu starken Stressbedingungen, wie geringem Nährstoffangebot, ausgesetzt, kann sie in ein Dauerstadium übergehen. In diesem stressresistenten Stadium kann sie bis zu vier Monate überdauern. Sind die Bedingungen für eine Weiterentwicklung wieder günstig, schließt sich dem Dauerstadium das Larvenstadium 4 an. Die Lebensdauer einer Nematode beträgt bei 20 °C ca. drei Wochen (Corsi 2006).

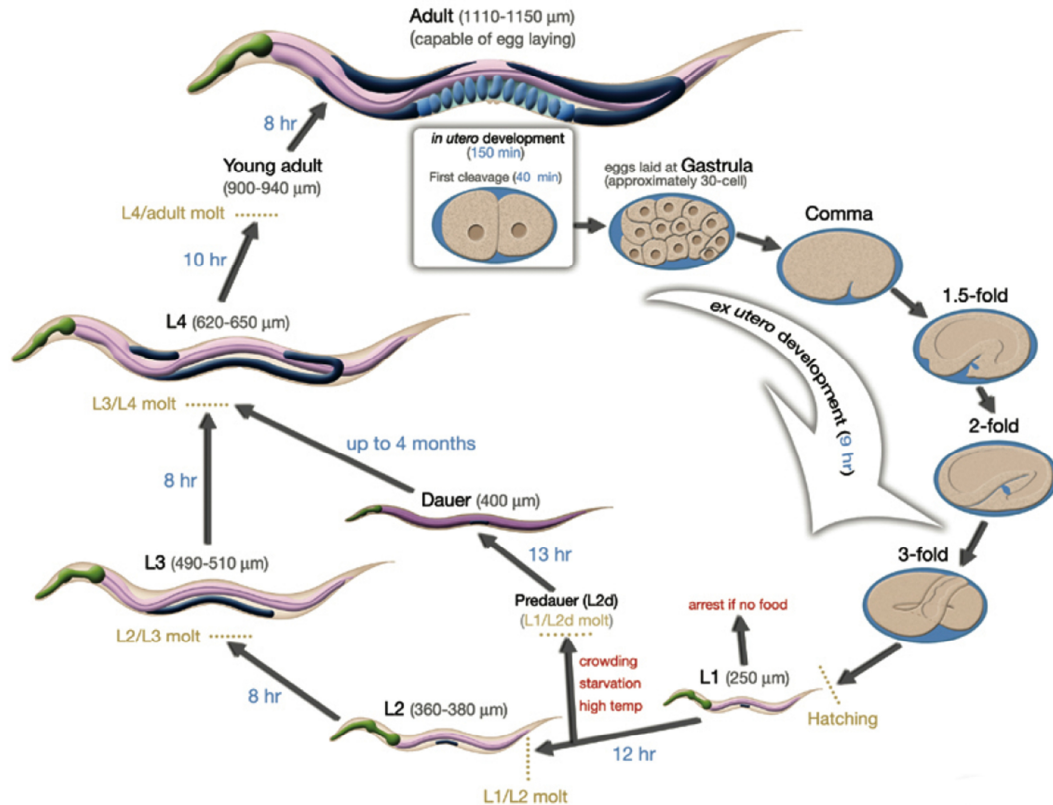


Abbildung 6. Entwicklungszyklus von *C. elegans*. Nachdem der Embryo das 28-30-Zell-Stadium erreicht hat, wird das Ei abgelegt. Nach Abschluss der Embryogenese durchläuft der Wurm die Larvenstadien 1-4 und entwickelt sich dann zum adulten Tier. Ist die L1-Larve während der Entwicklung zum Larvenstadium 2 zu starken Stressbedingungen ausgesetzt, kann sie in ein Dauerstadium übergehen und so bis zu vier Monate überdauern. Bei günstigen Bedingungen setzt sich die Entwicklung mit dem Larvenstadium 4 fort (Corsi, 2006).

Der Organismus *C. elegans* eignet sich vor allem für entwicklungsbiologische, genetische und physiologische Fragestellungen, wurde aber in jüngster Vergangenheit auch als Wirtsorganismus für Legionellen etabliert. Da beide Organismen in der Umwelt in feuchten Böden und Komposthaufen vorkommen, liegt die Vermutung einer tatsächlichen Interaktion zwischen Beiden nahe. Es konnte gezeigt werden, dass Legionellen den Verdauungstrakt von *C. elegans* zu besiedeln und sich dort zu vermehren. *L. pneumophila* ist in der Lage, Darmzellen zu invadieren und dort LCVs auszubilden. Sowohl die replikative Form als auch die Zysten-Form wurden zudem im Pseudocoelom und im gonadalen Gewebe von besiedelten Würmern nachgewiesen. Die Ausbildung von LCVs im gonadalen Gewebe ist Dot/Icm abhängig. Die

Lebenserwartung des Wurms wird durch eine Besiedlung mit *L. pneumophila* verkürzt (Komura *et al.*, 2010; Brassinga und Sifri, 2013; Moreno-Arriola *et al.*, 2014; Petersen *et al.*, 2015; Hellinga *et al.*, 2015).

3.5.2 Humanes, explantiertes Lungengewebe

Eine Erweiterung hinsichtlich der Infektionsmodelle stellt humanes, explantiertes Lungengewebe (auch HLTE für *human lung tissue explants*) dar. Der Vorteil dieses Systems ist, dass alle Zelltypen und extrazellulären Komponenten der menschlichen Lunge vorhanden sind. Wird HLTE-Gewebe mit Legionellen infiziert, spiegelt es die *in vivo* Bedingungen sehr realistisch wieder. Obwohl in HLTEs kein Blutstrom mehr vorhanden ist, konnte dennoch bedingt die Einwanderung von Neutrophilen und Makrophagen beobachtet werden (Jäger, Marwitz, *et al.*, 2014). Ein weiterer Vorteil dieses Modellsystem ist, dass es nicht nur für infektionsbiologische und histologische Fragestellungen geeignet ist, sondern durch die Fixierung mit HOPE-Lösung ebenso für RNA-Analysen in Frage kommt. Ein Nachteil ist, dass es sich bei den explantierten Lungen um Tumorgewebe und somit nicht um vollständig gesundes Gewebe handelt. Die verwendeten Stücke sind jedoch tumorfrei und stellen dadurch die größtmögliche Annäherung an gesundes, explantiertes Lungengewebe dar.

Wie auch schon in pathologischen Fallstudien und bei Meerschweincheninfektionen bestätigt, vermehrten sich die Legionellen innerhalb der HLTEs auch in den alveolaren Makrophagen und Epithelzellen. Außerdem konnte ein von *L. pneumophila* verursachter Gewebeschaden beobachtet werden, der sich u.a. durch den Verlust der Integrität der alveolaren Septen und der Delaminierung der Epithelzellen zeigt. Dieses Modell ist also eine neue Alternative, für die Untersuchung von *L. pneumophila* Pathogenitätsmechanismen (Jäger, Marwitz, *et al.*, 2014).

3.6 Virulenzfaktoren

Die Pathogenität von *L. pneumophila* ist auf zahlreiche Virulenzfaktoren zurückzuführen. Diese sind für die Replikation in der Wirtszelle und für zahlreiche andere Eigenschaften, wie Adhärenz, Motilität und Eisenaufnahme verantwortlich.

Wichtig für die Ausschleusung von Virulenzfaktoren von Legionellen sind die Sekretionssysteme, von denen in *L. pneumophila* drei bekannt sind.

Das Typ-I-Sekretionssystem (T1SS) ist in drei Bestandteile gegliedert, die in der inneren und äußeren Zellmembran lokalisiert sind. Die erste Komponente ist ein ABC-Transporter mit einer ATP-Bindekassette, die mit einer Transmembrandomäne in der Zytoplasmamembran verankert ist. Mit Hilfe dieser Domäne werden Substrate über ihre Signalsequenz erkannt, und der Sekretionsprozess wird eingeleitet. Das Membranfusionsprotein (MFP), welches aus einer kurzen zytoplasmatischen Domäne besteht, auf die ein Membrananker und eine lange periplasmatische Domäne folgen, bildet vermutlich die Verbindung zwischen den inneren und äußeren Membrankomponenten. Das Außenmembranprotein (OMP) der TolC-Klasse bildet einen Kanal durch die äußere Membran, der zur extrazellulären Seite hin geöffnet ist. Die Interaktion des C-terminalen Sekretionssignals mit dem ABC-Protein steuert die Anordnung des Sekretionskomplexes, sodass ein Kanal entsteht und das Substrat unter Spaltung von ATP sezerniert werden kann (Delepelaire, 2004). Bei Legionellen wurde das *lss*-Operon für die Kodierung des T1SS identifiziert (Jacobi und Heuner, 2003). Die Analyse einer *L. pneumophila lssBD*-Doppelmutante zeigte, dass das T1SS eine Rolle für die Virulenz von Legionellen spielt. Die Mutante konnte sich in den Wirtsorganismen *A. castellanii* und *D. discoideum* schlechter intrazellulär vermehren und war weniger zytotoxisch für *A. castellanii* und THP-1 Makrophagen als der Wildtyp. Des Weiteren ist das T1SS wichtig für den Eintritt in die Zelle, jedoch nicht für die Reifung der LCV, wie fluoreszenzmikroskopische Ko-Lokalisationsstudien belegen (Fuche *et al.*, 2015). Unter den T1SS-sezernierten und Virulenz-assoziierten Proteinen befindet sich ein RTX-Protein, das eine Rolle bei der Adhärenz an die Wirtszelle spielt. Außerdem haben RTX-Proteine eine zytotoxische Wirkung, da sie in der Lage sind, eine Porenbildung in der Wirtszelle zu veranlassen (Cirillo *et al.*, 2001; Fuche *et al.*, 2015).

Das Typ-II-Sekretionssystem (T2SS) von *L. pneumophila* wird von den *lsp*-Genen (*Legionella secretion pathway*) kodiert und ist in zwei Membran-Translokationsschritte aufgeteilt. Die Translokation durch die innere Membran erfolgt zunächst ungefalteter über das Sec-System oder gefaltet über den Tat-Transport. Die äußere Membran ist dagegen von einem *main terminal branch* Protein (MTBP) durchzogen, welches den Sekretionsapparat bildet. Auch dieses Protein spielt eine Rolle für die Pathogenität der

Legionellen. Mit Hilfe des T2SS werden mehr als 25 Effektoren sezerniert unter denen sich viele Virulenzfaktoren, wie Aminopeptidasen, RNAsen, Phospholipase A und ProA befinden (Lammertyn und Anné, 2004; Cianciotto, 2009; Tyson *et al.*, 2013). Die Zink-Metalloprotease ProA ist aufgrund ihrer geringen Substratspezifität in der Lage zahlreiche Substrate zu hydrolysieren (Keen und Hoffman, 1989; Quinn und Tompkins, 1989). Für die Funktion von ProA ist ein Cofaktor essentiell. Dazu dienen meist Zink-Ionen, aber auch andere zweiwertige Ionen kommen als Cofaktor in Frage (Dreyfus und Iglewski, 1986). Bei intranasaler oder intratrachealer Applikation von gereinigtem ProA können Blutungen und Gewebnekrosen im Lungenepithelgewebe von Meerschweinchen auftreten, die denen einer Legionelleninfektion gleichen (Baskerville *et al.*, 1981). Ebenso hat gereinigtes ProA eine zytotoxische Wirkung auf verschiedene Zelllinien, wie CHO-Zellen (Rechnitzer *et al.*, 1989). Bei Infektionsstudien in Meerschweinchen und Zelllinien mit ProA-defizienten Stämmen zeigten sich jedoch widersprüchliche Ergebnisse (Blander *et al.*, 1990; Moffat *et al.*, 1994; Hales und Shuman, 1999; Edelstein *et al.*, 1999; Rossier *et al.*, 2008).

Eine besondere Fortbewegungsart von *L. pneumophila* ist die Sliding Motility. Für diese Art der Motilität werden weder Pili noch Flagellen benötigt. Stattdessen werden im Zusammenspiel von T1SS und T2SS amphipathische, diffusionsfähige Tenside ausgeschüttet, auf denen sich Legionellen auf festen Oberflächen fortbewegen können. Die molekulare Basis der Tensidproduktion konnte derzeit noch nicht aufgeklärt werden (Stewart *et al.*, 2009; Stewart *et al.*, 2011).

Das *L. pneumophila* Typ-IV-Sekretionssystem (T4SS) sezerniert Proteine ähnlich wie das T2SS über zwei translozierende Schritte. Der Prozess startet mit einer Sec-abhängigen Translokation durch die innere Membran in den periplasmatischen Zwischenraum. Substrate des T4SS können entweder direkt in die Wirtszelle sezerniert oder in die Umgebung abgegeben werden. Das T4SS wird in zwei Subtypen untergliedert (Christie und Vogel, 2000). Das *L. pneumophila* Typ-IVa-Sekretionssystem (T4aSS) besteht aus 11 *lvh*-Genen. Dieses System spielt eine Rolle bei der Infektion von Legionellen bei 30 °C, und hat die Funktion eines konjugativen DNA-Transfer-Systems. Das *L. pneumophila* Typ-IVb-Sekretionssystem (T4bSS) ist in Bezug auf die Virulenz das bedeutendste Sekretionssystem der Legionellen. Es wird von den *dot/icm*-Genen (*Defect in organelle trafficking/intracellular multiplication*) auf zwei verschiedenen Pathogenitätsinseln des Chromosoms codiert. In der ersten Region

sind die Gene *icmXWV* und *dotABCD* zu finden. In der zweiten Region werden die Proteine IcmTSRQPONMLKEGCDJBF codiert. Die 24 *dot/icm*-Gene bilden den größten zusammenhängenden Virulenzloкус im *Legionella*-Genom. Dieses Sekretionssystem sezerniert über 300 Effektoren und spielt eine entscheidende Rolle bei der intrazellulären Replikation in Wirtszellen. Hierbei ist es vor allem für die Unterbindung der phagolysosomalen Fusion und somit für die Etablierung der LCV zuständig. Dies ist die Voraussetzung für die effiziente Vermehrung der Bakterien in ihren Wirtszellen (Hilbi *et al.*, 2001; Lammertyn und Anné, 2004).

L. pneumophila bildet zur Ausschleusung von Effektoren zusätzlich äußere Membran Vesikel (engl. *outer membrane vesicles*, OMVs). Diese entstehen durch Ausstülpung und Abschnürung der äußeren Membran und enthalten Proteasen, Hydrolasen, Chitinasen, Phosphatasen. OMVs schützen die Effektoren vermutlich vor dem Abbau durch extrazelluläre Wirtsproteasen, -nukleasen und -lipasen (Fernandez-Moreira *et al.*, 2006; Galka *et al.*, 2008; Ellis und Kuehn, 2010). In neusten Studien konnte gezeigt werden, dass *L. pneumophila* OMVs eine asymmetrische Zusammensetzung der äußeren Bakterienmembran darstellen und als Bilayer vorliegen. Des Weiteren sind sie in der Lage an die äußere Membran von Makrophagen zu binden und werden schließlich internalisiert. In der Zelle entfalten sie ihre biologische Aktivität (Jäger, Keese, *et al.*, 2014). Werden HLTEs mit aufgereinigten OMVs inkubiert, ist ein ähnlicher Gewebeschaden wie bei der Infektion mit *L. pneumophila* zu beobachten. Es kommt zur Delaminierung der Epithelzellen, und Desintegration der alveolaren Septen. Lokalisiert wurden die OMVs hauptsächlich in den alveolaren Makrophagen (Jäger, Marwitz, *et al.*, 2014).

Ein weiterer wichtiger Aspekt für das Überleben und die Virulenz von Legionellen ist die Verfügbarkeit von Fe^{3+} . *L. pneumophila* verfügt über das Siderophor Legiobactin und die Eisenreduktase Pyomelanin, um Eisen aus der Umwelt oder von der Wirtszelle zu rekrutieren. Durch die Rekrutierung von Eisen wird die intrazelluläre Vermehrung in der Wirtszelle begünstigt (Cianciotto, 2007; Chatfield und Cianciotto, 2007; Newton *et al.*, 2010).

Zu den extrazellulären Virulenzfaktoren zählen Flagellen, Pili, LPS und MOMP. Legionellen besitzen eine oder mehrere polare oder laterale Flagellen, die die Beweglichkeit gewährleisten. Mit dem Eintritt in die stationäre Wachstumsphase wird die Flagelle gebildet. Sie besteht aus der vom *flaA*-Gen codierten Untereinheit Flagellin

und fördert die Aufnahme von Legionellen in *A. castellanii* und HL-60-Zellen (Dietrich *et al.*, 2001; Heuner *et al.*, 2002).

Typ IV-Pili sind Oberflächenstrukturen mit einer Länge von 0,1 bis 1,5 μm , und bestehen aus flexiblen Filamenten mit globulärem Pilinkopf. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der komplementunabhängigen Aufnahme der Legionellen in Makrophagen und Lungenepithelzellen (Stone und Abu Kwaik, 1998). Außerdem sind sie wichtig für die Besiedlung und den Erhalt von Biofilmen (Lucas *et al.*, 2006). Durch Ausstrecken, Anhaften und Einfahren der Typ IV-Pili können sich Legionellen über feste und halb feste Oberflächen bewegen. Dieser Vorgang nennt sich Twitching Motility (Coil und Anné, 2009).

Die Lipopolysaccharidhülle (LPS-Hülle) ist ebenso ein wichtiger Virulenzfaktor für Legionellen. Das Lipid A, ein Bestandteil des LPS, unterscheidet sich im Aufbau von dem anderer Gram-negativer Bakterien. Es ist aus langkettigen, verzweigten Fettsäuren aufgebaut, an denen Legionaminsäuren gebunden sind, die keine Hydroxylgruppen besitzen (Palusińska-Szyszk und Russa, 2009). Dieser Aufbau verleiht dem LPS eine große Hydrophobizität, was bei der Übertragung von Legionellen über Aerosole eine Rolle spielt (Helbig *et al.*, 1995).

Das Protein MOMP (engl. major outer membrane protein) ist mit der äußeren Membran von Legionellen assoziiert und das häufigste Protein auf der Oberfläche. Es ist für die Komplement-bedingte Aufnahme in Makrophagen verantwortlich, da es an den Komplementfaktor C3 binden kann (Krinos *et al.*, 1999).

3.6.1 Peptidylprolyl *cis/trans* Isomerasen

Bei der Faltung von Proteinen wird das *trans*-Konformer der Peptidbindung energetisch bevorzugt (Abb. 7A). Bei Peptidylprolyl-Bindungen gibt es wegen der besonderen Struktur des Prolins jedoch keine energetisch günstigere Konformation (Abb. 7B). Daraus resultieren Probleme bei der korrekten Faltung von Proteinen (Brandts *et al.*, 1975; Cook *et al.*, 1979). Peptidylprolyl *cis/trans* Isomerasen (PPIasen) katalysieren die Isomerisierung dieser Bindungen und unterstützen damit die Proteinfaltung (Göthel *et al.*, 1996). Diese Superfamilie von Proteinen kommt ubiquitär vor und unterteilt sich in drei Klassen, die sich auf Basis von Strukturhomologie und Bindungsaffinität zu natürlich vorkommenden Inhibitoren unterscheiden: (A) Cyclophiline, (B) Parvuline

und (C) FK506-bindende Proteine (FKBPs). Die PPIase-Funktion dieser Klassen kann durch (A) Cyclosporin A, (B) Juglone und (C) FK506 und Rapamycin gehemmt werden.

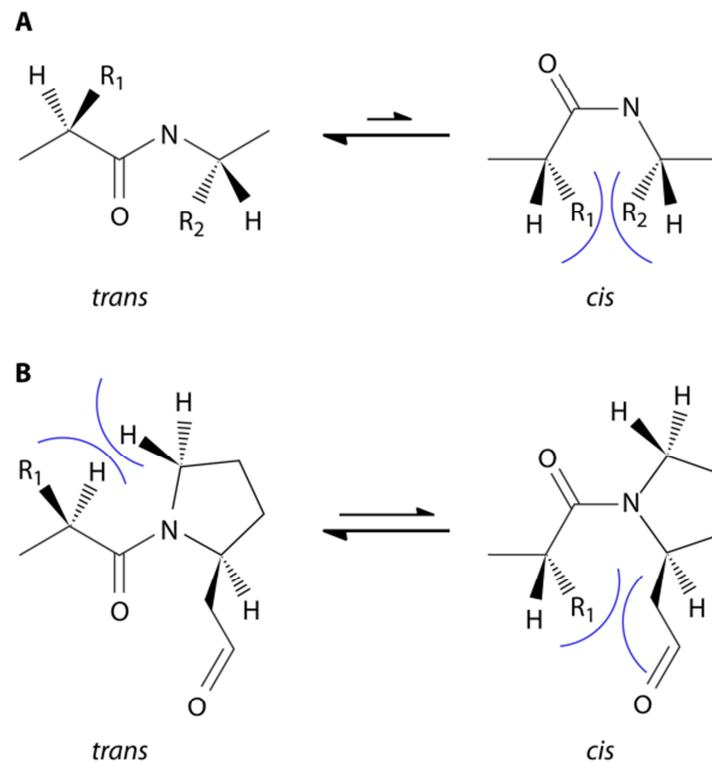


Abbildung 7: Die Konformere von Peptidbindungen. (A) Die *trans*-Konformation ist generell energetisch günstiger, da hier eine geringere sterische Hemmung durch die Seitenketten (R_1 und R_2) vorliegt. (B) Bei Prolinen ist die α -Aminogruppe Teil der Seitenkette. Dadurch bildet sich eine Imid-Peptid-Bindung und der energetische Unterschied der beiden Konformeren ist niedrig. Etwa 5-6 % der Peptidylprolyl-Bindungen liegen in der *cis*-Konformation und die Halbwertszeit der Isomerisierung dauert von Sekunden bis hin zu Minuten und ist somit sehr lang (Ünal and Steinert, 2014).

Neben der enzymatischen Aktivität übernehmen PPIasen auch diverse zelluläre Funktionen als Chaperone und als untergeordnete Proteine in Multiprotein-Komplexen. PPIasen haben meist pleiotrope Funktionen, was es oft schwer macht, ihre eigentliche physiologische Rolle zu entschlüsseln (Schiene-Fischer *et al.*, 2011; Rasch *et al.*, 2014).

In *L. pneumophila* wurden sechs PPIasen annotiert, je zwei Cyclophiline (PpiA, PpiB), Parvuline (PpiD, SurA) und FKBP (Trigger Faktor und Mip). Das Cyclophilin PpiA von *L. pneumophila* ist ein 188 AA Protein, was bisher nur wenig analysiert wurde. Es kann vermehrt im Überstand von *L. pneumophila*-Flüssigkulturen nachgewiesen werden, die bei 17 °C und 12 °C kultiviert wurden. Dennoch konnte die Relevanz von PpiA für das Wachstum bei niedrigen Temperaturen nicht mit Hilfe einer Deletionsmutante bestätigt werden. Ein Grund dafür könnte ein kompensatorischer Effekt durch andere PPIasen, wie PpiB, sein (Söderberg and Cianciotto, 2008; Rasch *et al.*, 2014).

Die Parvuline PpiD und SurA und das FKBP Trigger Faktor wurden für Legionellen bisher nicht analysiert, weshalb über Funktionen, Struktur und physiologische Rolle bisher nichts bekannt ist (Rasch *et al.*, 2014).

3.6.1.1 Die Peptidylprolyl *cis/trans* Isomerase PpiB

Das Cyclophilin PpiB (Lcy) ist ein 18 kDa großes Protein, welches zuerst im Jahr 1996 beschrieben wurde. Es besitzt eine PPIase-Aktivität, die mit der von Cyclophilin A vergleichbar ist. PpiB besitzt keine bekannte Signalsequenz und wurde deshalb als zytoplasmatisches Protein eingeordnet und auch im Cytoplasma nachgewiesen (Schmidt *et al.*, 1996). Obwohl PpiB beim Wachstum von Legionellen unter Standardbedingungen keine Rolle spielt, wurde es im Kulturüberstand nach der Kultivierung bei 12 °C und 17° C vermehrt nachgewiesen. Da bisher PpiB als Bestandteil des Sekretoms nicht bekannt war, wurden verschiedene *Legionella*-Sekretionssystem-Mutanten auf die Sekretion dieses Proteins hin untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass keins der bisher bekannten Sekretionssysteme für die Ausschleusung von PpiB verantwortlich ist. Da eine Lyse der Zellen ausgeschlossen werden konnte, wird vermutet, dass dieses Protein über einen bisher unbekannten Mechanismus sezerniert wird.

In Hinblick auf die Akkumulation während des Wachstums bei niedrigen Temperaturen wurde eine Deletionsmutante hergestellt. Diese zeigte ein Wachstumsdefizit auf BCYE-Agar bei 12 °C. PpiB spielt demnach eine Rolle für das Wachstum bei niedrigen Temperaturen. Bei Infektionsstudien mit *A. castellanii* wurde gezeigt, dass PpiB einen

leichten Einfluss auf die intrazelluläre Replikation hat, was auf eine geringere Invasionsrate zurückzuführen ist (Söderberg und Cianciotto, 2008; Rasch *et al.*, 2014).

3.6.1.2 Die Peptidylprolyl *cis/trans* Isomerase Mip

Das Mip-Protein (*Macrophage infectivity potentiator*) ist eine sehr gut charakterisierte PPIase von *L. pneumophila* (Fischer *et al.*, 1992). Die Analyse des Mip-Promotors erwies, dass das Mip-Protein fast durchgehend gebildet wird. Die Ausnahme ist, dass während der Infektion eines Wirts in dem Zeitraum zwischen 3 und 24 h etwas weniger *mip* transkribiert wird als zuvor (Wieland *et al.*, 2002).

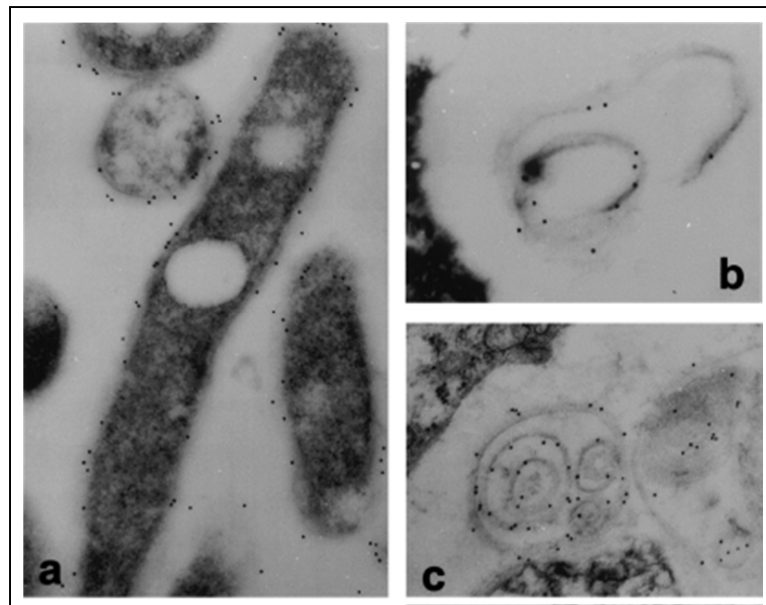


Abbildung 8. Immunogold-Elektronenmikroskopie von *L. pneumophila* Corby. (A) Die Bakterien wurden auf BCYE-Agar angezogen, mit einem anti-Mip Antikörper inkubiert und mikroskopiert. Mip ist an der äußeren Membran von Legionellen assoziiert. (B und C) *A. castellanii* wurde mit *L. pneumophila* infiziert. Nach 6 h wurden die Phagosomen mit einem anti-Mip Antikörper inkubiert und mikroskopiert. In den multilamellaren Strukturen der Wirtszelle konnte Mip ebenfalls nachgewiesen werden (Helbig *et al.*, 2001).

Elektronenmikroskopische Lokalisationsstudien ergaben, dass Mip-Protein gleichmäßig auf der Oberfläche der äußeren Membran von *L. pneumophila* verteilt ist (Abb. 8). Mip besitzt jedoch keine Transmembrandomäne und ist somit nur mit der äußeren Membran

assoziiert. Im Zytoplasma und im Überstand konnte das Protein nicht nachgewiesen werden. Bei der Kultivierung von Legionellen in *A. castellanii* konnte Mip nach sechs Stunden nicht nur auf der Oberfläche der Legionellen lokalisiert werden, sondern auch auf den Wirtsmembranen, von denen das Phagosom umgeben ist (Helbig *et al.*, 2001; Riboldi-Tunnicliffe *et al.*, 2001; Galka *et al.*, 2008).

Die Entschlüsselung der Kristallstruktur (Abb. 9) zeigte, dass Mip als Homodimer vorliegt. Jedes Monomer hat ein Molekulargewicht von 22,8 kDa. Die N-terminale Domäne ist mit einer Linker-Helix ($\alpha 3$) über eine acht Aminosäuren lange Schleife verbunden. Die Linker-Helix besteht aus den Aminosäuren 54-98 und ist die längste freistehende α -Helix die bisher bekannt ist. Sie ist mit der C-terminalen Domäne über eine zwei Aminosäure lange Wendung verbunden. Diese FKBP Domäne besteht aus sechs antiparallelen β -Faltblättern mit einer kurzen α -Helix ($\alpha 4$) (Riboldi-Tunnicliffe *et al.*, 2001).

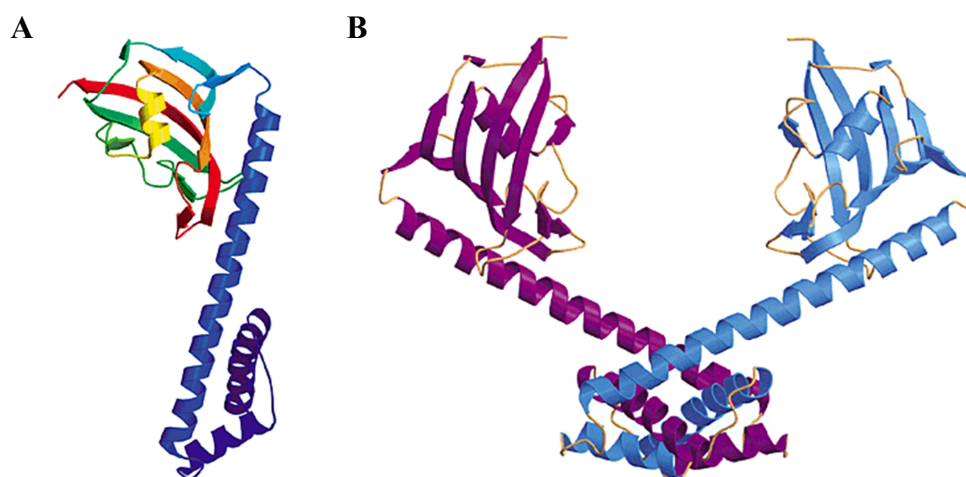


Abbildung 9: Kristallstruktur des Mip-Proteins. (A) Das Mip-Monomer hat ein Molekulargewicht von 22,8 kDa, und besteht aus einer α -helikalen N-terminalen Domäne gefolgt von einer langen, allein stehenden α -Helix und einer globulären C-terminalen Domäne mit PPIase-Aktivität. (B) Die Dimerisierung der Monomere erfolgt über den N-Terminus (Riboldi-Tunnicliffe *et al.*, 2001).

Mit Hilfe von NMR-Strukturanalysen mit ^2H , ^{13}C und ^{15}N -markiertem Mip-Protein konnte die Beweglichkeit der dimerisierenden α -Helix am Scharnier gezeigt werden. Dadurch kann sich die Distanz zwischen den beiden C-terminalen Domänen verändern,

so dass vermutlich auch größere Zielmoleküle gebunden werden können (Horstmann *et al.*, 2005; Horstmann *et al.*, 2006).

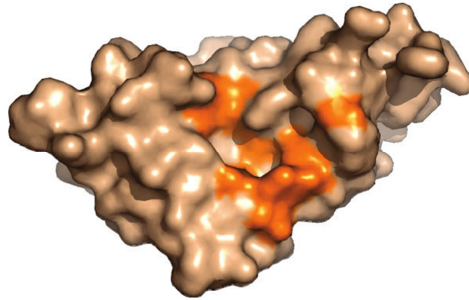


Abbildung 10: NMR-Spektroskopische Darstellung der C-terminalen Domäne von Mip. Das aktive Zentrum der PPIase ist orange hervorgehoben (Juli *et al.*, 2011).

Mip besitzt eine PPIase-Aktivität, die im C-Terminus des Proteins lokalisiert ist. Der C-Terminus kann aufgrund seiner Aminosäuresequenz und seiner Struktur der katalytischen Domäne den FK506 bindenden Proteinen (FKBPs) zugeordnet werden (Riboldi-Tunnicliffe *et al.*, 2001). Durch die Bindung von natürlich vorkommenden Makroliden FK506 und Rapamycin an das aktive Zentrum (Abb. 11), kann die PPIase-Aktivität gehemmt werden (Riboldi-Tunnicliffe *et al.*, 2001; Ceymann *et al.*, 2008).

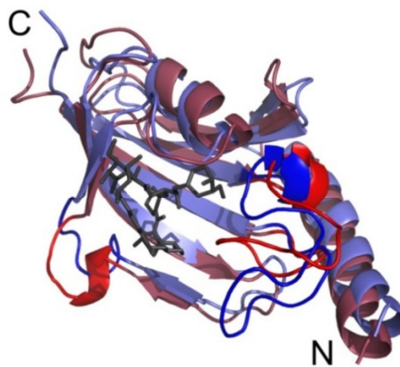


Abbildung 11: Überlagerung der NMR-Strukturen des Mip-Proteins mit (blau) und ohne (rot) Rapamycin-Bindung. Rapamycin (schwarz) ist im aktiven Zentrum des Mip-Proteins gebunden, was zu einer Veränderung der PPIase-Domäne und des Hairpin-Loops führt (Ceymann *et al.*, 2008).

Die Bindung des Makrolids Rapamycin ruft vermutlich einen chemischen Shift im Loop zwischen Strang β_4 und der Helix α_4 hervor, was zu einer strukturellen Neuordnung der PPIase-Domäne und des Hairpin-Loops führt. Die Gesamtstruktur des Mip-Proteins bleibt jedoch nahezu unverändert (Abb. 11) (Ceymann *et al.*, 2008).

Das Mip-Protein ist in der Lage mit dem C-Terminus spezifisch an Kollagen I, II, III, IV, V und VI zu binden, verändert dadurch aber nicht deren Struktur. Die Bindung an Kollagen IV ist davon die stärkste (Wagner *et al.*, 2007). Mit Hilfe von Kollagen IV-Peptidmembranen und Co-Präzipitationsexperimenten wurde das von Kollagen abgeleitete Peptid P290 isoliert. Dieses Peptid ist in der Lage die Bindung von Mip an Kollagen IV vollständig zu inhibieren. Ein NMR-Modell der Bindung von Mip an P290 (Abb. 12) zeigte, dass die hydrophobe Aminosäure D142 und in einem geringeren Ausmaß auch Y185 Teil der Interaktion sind. Die Transmigration von *L. pneumophila* durch das Transwell-NCI-H292-Lungenepithelsystem konnte durch die Bindung von P290 stark verringert werden (Ünal *et al.*, 2011).

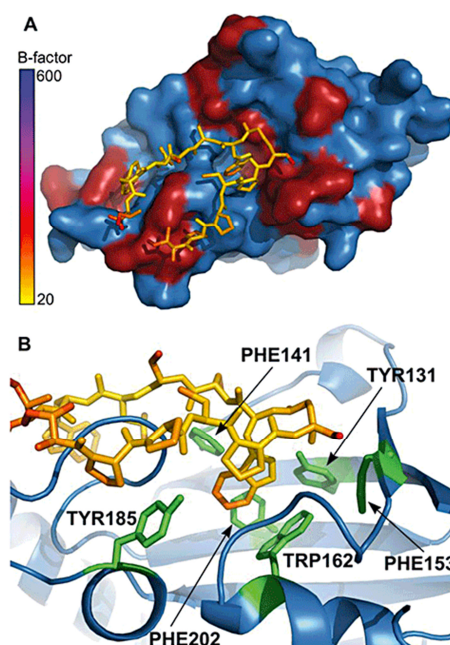


Abbildung 12. Bindung von P290 an die C-terminale Domäne von Mip. (A) Der C-Terminus des Mip-Proteins ist in Blau dargestellt und die Interaktions-relevanten Bereiche darunter in Rot. P290 fügt sich in die Bindetasche des Proteins ein. (B) An der Bindung von P290 (in Gelb) an das Mip-Protein sind insbesondere die Aminosäuren hauptsächlich Trp162 und Tyr185, in der enzymatisch aktiven Tasche der PPIase beteiligt (Ünal *et al.*, 2011).

Mip wurde schon im Jahr 1989 als Virulenzfaktor von *L. pneumophila* identifiziert (Cianciotto *et al.*, 1989; Engleberg *et al.*, 1989). Seitdem wurden zahlreiche Infektionsstudien durchgeführt, um die Bedeutung des Mip-Proteins und der PPIase-Aktivität für *L. pneumophila* zu charakterisieren. Mip-negative Stämme zeigen eine geringere intrazelluläre Replikation in Makrophagen, Epithelzellen und Amöben. Im Meerschweinchen-Modell sind sie attenuiert (Wintermeyer *et al.* 1995, Cianciotto und Fields 1992). Eine *Legionella*-Mutante mit N-terminal verkürztem Mip-Protein zeigte wie die Mip-negative Mutante eine verringerte intrazelluläre Vermehrungsrate in *A. castellanii*, der Makrophagenzelllinie U937, und war in Meerschweinchen attenuiert. Die Dimerisierung des Proteins ist somit wichtig für die Virulenz des Mip-Proteins (Köhler *et al.*, 2003). Des Weiteren gab es zahlreiche Untersuchungen zur Bedeutung der PPIase-Aktivität für die Virulenz, die unterschiedliche Ergebnisse lieferten. Eine *Legionella*-Mutante mit einer verminderten PPIase-Aktivität des Mip-Proteins hatte keine Auswirkung auf den Infektionsverlauf in *Acanthamoeba castellanii* und der Makrophagenzelllinie U937 (Köhler *et al.*, 2003). Bei Transmigrationsstudien mit dem Transwell-NCI-H292-Lungenepithelmodell wies die Mutante dagegen eine geringere Transmigration im Vergleich zum Wildtyp auf. Außerdem wurde beobachtet, dass die Hemmung der PPIase-Aktivität des Wildtyps mittels Rapamycin- und FK506-Zugabe die Transmigrationsrate gleichermaßen senkt. Die PPIase-Funktion beeinflusst die Transmigration durch das Lungenepithelgewebe (Wagner *et al.*, 2007). Darüber hinaus wurden auch Meerschweinchen mit dieser Mutante infiziert. *In vivo* zeigte sie eine Verminderung der intrazellulären Replikation im Vergleich zum Wildtyp (Köhler *et al.*, 2003). Diese Ergebnisse legen die Theorie nahe, dass die PPIase-Aktivität des Mip-Proteins bei der intrazellulären Vermehrung in monozellulären Wirtssystemen keine Rolle spielt, in Geweben oder bei Gewebebarrieren jedoch schon (Rasch, 2011).

In vielen anderen intrazellulären Pathogenen, wie *Chlamydia spp.*, *Coxiella burnetii*, *Escherichia coli* und *Trypanosoma cruzii* wurden Mip-ähnliche Proteine gefunden (Lundemose *et al.*, 1992; Horne und Young, 1995; Moro *et al.*, 1995; Mo *et al.*, 1995; Riboldi-Tunnicliffe *et al.*, 2001). Viele Mip-Homologe lassen sich durch ihre Struktur in die Gruppe der FKBP einordnen und haben eine PPIase-Aktivität. Da PPIase-Inhibitoren wie Rapamycin sowohl die Aktivität in *L. pneumophila* als auch in anderen Pathogenen ausschalten können, ist die PPIase-Domäne ein geeignetes Ziel für die Entwicklung neuer Wirkstoffe (Rasch *et al.*, 2014).

3.7 Zielsetzung der Arbeit

Seit der Entdeckung von Mip im Jahr 1989 war sowohl die PPIase-Funktion als auch das gesamte Protein Gegenstand intensiver Studien. Dennoch konnte die Funktion des Mip-Proteins im Ganzen nicht aufgeklärt werden.

Diese Arbeit soll die Funktion des Mip-Proteins durch die Betrachtung verschiedener Perspektiven aufklären. Daraus ergibt sich die Untergliederung in drei Teile:

- (I) Analyse des Mip-Proteins als indirekter Virulenzfaktor für intrazelluläre Replikation,
- (II) Einfluss von neuartigen Cycloheximid-Derivaten auf das Wachstum und die Mip-abhängige intrazelluläre Replikation von *L. pneumophila*,
- (III) Analyse der Bedeutung von Mip für die Etablierung von *L. pneumophila* in der Umwelt.

- (I) Der erste Teil beschäftigte sich mit der Rolle von Mip während der Infektion von humanem Lungengewebe mit *L. pneumophila*. Es sollten HLTEs mit Wildtyp und Mip-defizienter Mutante infiziert und dann sowohl Vermehrungsstudien als auch histologische Studien durchgeführt werden. Zudem sollten die Sekretionsprofile der beiden Stämme verglichen werden, um neuartige Virulenzfaktoren zu identifizieren und zu charakterisieren. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob eine weitere PPIase der Legionellen, PpiB, die fehlende PPIase-Aktivität in der Mip-negativen Mutante zum Teil oder komplett kompensieren kann.
- (II) Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob neuartige Cycloheximid-Derivate, die in der Lage sind, die PPIase-Funktion des Mip-Proteins zu inhibieren, einen Einfluss auf das Wachstum und die intrazelluläre Replikation von *L. pneumophila* haben.
- (III) Im dritten Teil dieser Arbeit sollten natürliche Biofilme, in denen sowohl Nematoden als auch Legionellen nachgewiesen werden konnten, mit Fluoreszenz-markierten Legionellen infiziert werden. Dies sollte Aufschluss darüber geben, ob Legionellen sich im Darm von natürlich vorkommenden Nematoden ansiedeln können. Zudem sollten Persistenz- und Survivalexperimente in *C. elegans* Aufschluss über die Rolle von Mip bei der Verbreitung der Legionellen in der Umwelt geben.

4 Material und Methoden

4.1 Geräte

Für die Durchführung der Experimente wurden folgende Geräte verwendet (Tab. 1):

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller	Typ
CO ₂ Inkubator	Sanyo	MCO-18 AIC (UV)
	Sanyo	MIR-253
Magnetrührer	IKA	RH basic 2
Mikroliterpipetten	Rainin	pipet lite XLS
	Brand	Transferpette S
Automatische Pipette	Brand	Handy Step [®] electronic
Mehrkanalpipetten	Rainin	pipet lite XLS
Homogenisator	Polytron	PT2500E
SpeedVac	Eppendorf	Concentrator 5301
Inverses Lichtmikroskop	ZEISS	Axiovert 35M
pH- Meter	Metrohm	827 pH lab
	Schott Instruments	Lab 850
Sicherheitswerkbank	Thermo Scientific	Hera Safe
Spektralphotometer	Biochrom	Libra S22
Vortexer	Scientific Industries	Vortex genie 2
Thermoblock	Eppendorf	Thermomixer comfort
	Peqlab	Thriller
Standardwaage	Sartorius	BL 1500
Feinwaage	Sartorius	TE 2145
Wasserbad	GFL	1002
Zentrifugen	Eppendorf	5424
	Beckman Coulter	Allegra X-12R
	Hermle Labortechnik	Z 216 MK
	Sigma	2 K 15 C

Ultrazentrifuge	Beckman Coulter	Optima™ Ultracentrifuge	L-90K
Power supply	Peqlab	EV222	
	Peqlab	EV231	
SDS-Gelkammer	Biorad	Mini-Protean Tetra Cell	
	Biorad	Mini-Protean 3	
	Biorad	PROTEAN® Plus Dodeca cell	
DNA-Gelkammer	GP Kunststofftechnik	Mini	
Isoelektrische Fokussierung	Biorad	PROTEAN® i12™ System	IEF
Massenspektrometrie	Thermo Scientific	LTQ Orbitrap™ XL	
	Waters	SYNAPT G2-S Spectrometer	Mass
Geldokumentationsanlage	DC Science Tec	DeVision G	
Thermocycler	Peqlab	Peqstar 96 Universal Gradient	
	Biorad	T100 Thermal Cycler	
Reinstwasseranlage	Millipore	MilliQ Synthesis A10	
Sequenzierer	Applied Biosystems	ABI PRISM 310 Genetic Analyser	
Elektroblot	Peqlab	PerfectBlue Semi-Dry Electro Blotter	
	Biorad	Trans-Blot® Turbo	
French Press	Thermo	French Pressure Cell Press	
Floureszenzmikroskop	Zeiss	Axioskop MI 100; Axiovert 35 M	
	Leica	DM6000 CS; TCS SP5	

4.2 Verbrauchsmaterialien

Allgemeine Verbrauchsmaterialien, wie serologische Pipetten, Pipettenspitzen für manuelle Ein- und Mehrkanalpipetten, Einwegküvetten, Sterilfilter, Kryoröhrchen, sterile Spritzen und Reaktionsgefäße wurden über unterschiedliche Firmen, wie z.B. Sarstedt, BD Falcon, Brand, Eppendorf und Greiner bio-one bezogen. Chemikalien

stammen von den Firmen Sigma-Aldrich, Roth, Merck, GE Healthcare, Invitrogen und Oxoid. Besondere Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Verbrauchsmaterial für Infektionen

Bezeichnung	Bezugsquelle
Zellkulturflaschen 25 cm ²	BD Falcon (353108)
Zellkulturflaschen 75 cm ²	TPP (90076)
Multiwellplatten	BD Falcon (12er: 351143),
24 und 96 Wells, unbehandelte Oberflächen	Sarstedt (24er: 83.1836)
	Sarstedt (96er: 82.1582.001)
Zählkammer „Fuchs-Rosenthal“	Assistant

4.3 Zellen, Bakterienstämme, Vektoren, Primer und Enzyme

Tabelle 3: Verwendete Zelllinie

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
THP-1	Humane leukämische Monozyten, Lymphomzelllinie	ACC16, DSMZ
<i>D. discoideum</i> AX2	Axenischer Stamm	M. Schleicher, LMU München
<i>A. castellanii</i>	Axenischer Stamm	ATCC 30234

Tabelle 4: Verwendete Nematoden

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
<i>Caenorhabditis elegans</i>	WT N2	Prof. Dr. R. Schnabel, Inst. f. Genetik, TU Braunschweig, (Brenner, 1974)

Tabelle 5: Verwendete Bakterienstämme

Bakterienstamm	Beschreibung	Referenz
<i>Escherichia coli</i> DH10β	<i>F⁻ endA1 recA1 galE15 galK16 nupG rpsL ΔlacX74 Φ80lacZΔM15 araD139 Δ(ara,leu)7697 mcrA Δ(mrr- hsdRMS-mcrBC) λ⁻ Sm^r</i>	Invitrogen

<i>Escherichia coli</i> OP50	Uracil auxothroph, limitiertes Wachstum auf NGM	(Brenner, 1974)
<i>Escherichia coli</i> BL21	<i>fhuA2 [lon] ompT gal [dcm] ΔhsdS</i>	NEB
<i>Escherichia coli</i> BL21 PpiB	<i>fhuA2 [lon] ompT gal [dcm] ΔhsdS</i> mit Plasmid pJRP1- <i>ppiB</i> kloniert in pET52b (+) mit <i>SmaI</i> und <i>SacI</i>	Diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i> BL21 LpC_2560	<i>fhuA2 [lon] ompT gal [dcm] ΔhsdS</i> mit Plasmid pJRP2- <i>LpC_2560</i> kloniert in pET52b (+) mit <i>SmaI</i> und <i>SacI</i>	Diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i> BL21 LpC_0801	<i>fhuA2 [lon] ompT gal [dcm] ΔhsdS</i> mit Plasmid pJRP3- <i>LpC_0801</i> kloniert in pET52b (+) mit <i>SmaI</i> und <i>SacI</i>	Diese Arbeit
<i>Legionella pneumophila</i> Corby	WT	(Jepras <i>et al.</i> , 1985)
<i>Legionella pneumophila</i> Corby mCherry	WT mit Plasmid pXDC50 - mCherry	(Charpentier <i>et al.</i> , 2011) (Plasmid)
<i>Legionella pneumophila</i> Corby dotA-	<i>dotA::tn5</i> Mutante	Antje Flieger, RKI, Wernigerode
<i>Legionella pneumophila</i> Corby Δmip	<i>mip::nptI</i> Mutante	(Wintermeyer, 1994)
<i>Legionella pneumophila</i> Corby Mip (+)	<i>mip::nptI</i> Mutante mit Plasmid pEWM103	(Wintermeyer, 1994)
<i>Legionella pneumophila</i> Corby ΔppiB	<i>ppiB::nptI</i> Mutante	Diese Arbeit- (Heinsohn, 2013)
<i>Legionella pneumophila</i> Corby PpiB (+)	<i>ppiB::nptI</i> Mutante mit Plasmid pJRA1 – <i>ppiB</i> kloniert in pBCKS(+) mit <i>SacI</i> und <i>KpnI</i>	Diese Arbeit- (Heinsohn, 2013)

<i>Legionella pneumophila</i> Corby Δ mip Δ ppiB ($\Delta\Delta$)	<i>mip::nptI</i> und <i>ppiB::cat</i> Mutante	Diese Arbeit
<i>Legionella pneumophila</i> Corby Δ 2560	<i>LpC_2560::nptI</i> Mutante	Diese Arbeit- (Tran, 2013)
<i>Legionella pneumophila</i> Corby LpC_2560 (+)	<i>LpC_2560::nptI</i> Mutante mit Plasmid pJRA2 – <i>LpC_2560</i> kloniert in pBCKS(+) mit <i>SacI</i> und <i>KpnI</i>	Diese Arbeit
<i>Legionella pneumophila</i> Corby LpC_2560	WT mit Plasmid pJRA3 – <i>LpC_2560</i> kloniert in pBCKS(+) mit <i>SacI</i> und <i>KpnI</i>	Diese Arbeit- (Tran, 2013)
<i>Legionella pneumophila</i> Corby Δ 0801	<i>LpC_0801::nptI</i> Mutante	Diese Arbeit- (Tran, 2013)
<i>Legionella pneumophila</i> Corby LpC_0801 (+)	<i>LpC_0801::nptI</i> Mutante mit Plasmid pJRA4 – <i>LpC_0801</i> kloniert in pBCKS(+) mit <i>SacI</i> und <i>KpnI</i>	Diese Arbeit
<i>Legionella pneumophila</i> Corby Δ tolC	<i>tolC::nptI</i> Mutante	(Glöckner <i>et al.</i> , 2008)
<i>Legionella pneumophila</i> Corby Δ lssB	<i>lssB::nptI</i> Mutante	(Jacobi und Heuner, 2003)
<i>Legionella pneumophila</i> Corby Δ tatC	<i>tatC::nptI</i>	(Glöckner <i>et al.</i> , 2008)
<i>Legionella pneumophila</i> Corby Δ lspDE	<i>dotA::tn5</i> Mutante	Antje Flieger, RKI, Wernigerode, D

Tabelle 6: Verwendeter Vektor

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
Vektor pET52b(+)	T7 Promoter, optimierte RBS, T7 Transkriptionsstart, Strep•Tag II, MCS, 10X•His•Tag, T7 Terminator, lacI, Amp ^r	Novagen
pBC KS (+)	Vektor mit α -Fragment der β -Galactosidase, T7 und T3 Promotor, Cm ^r	Genomics Agilent

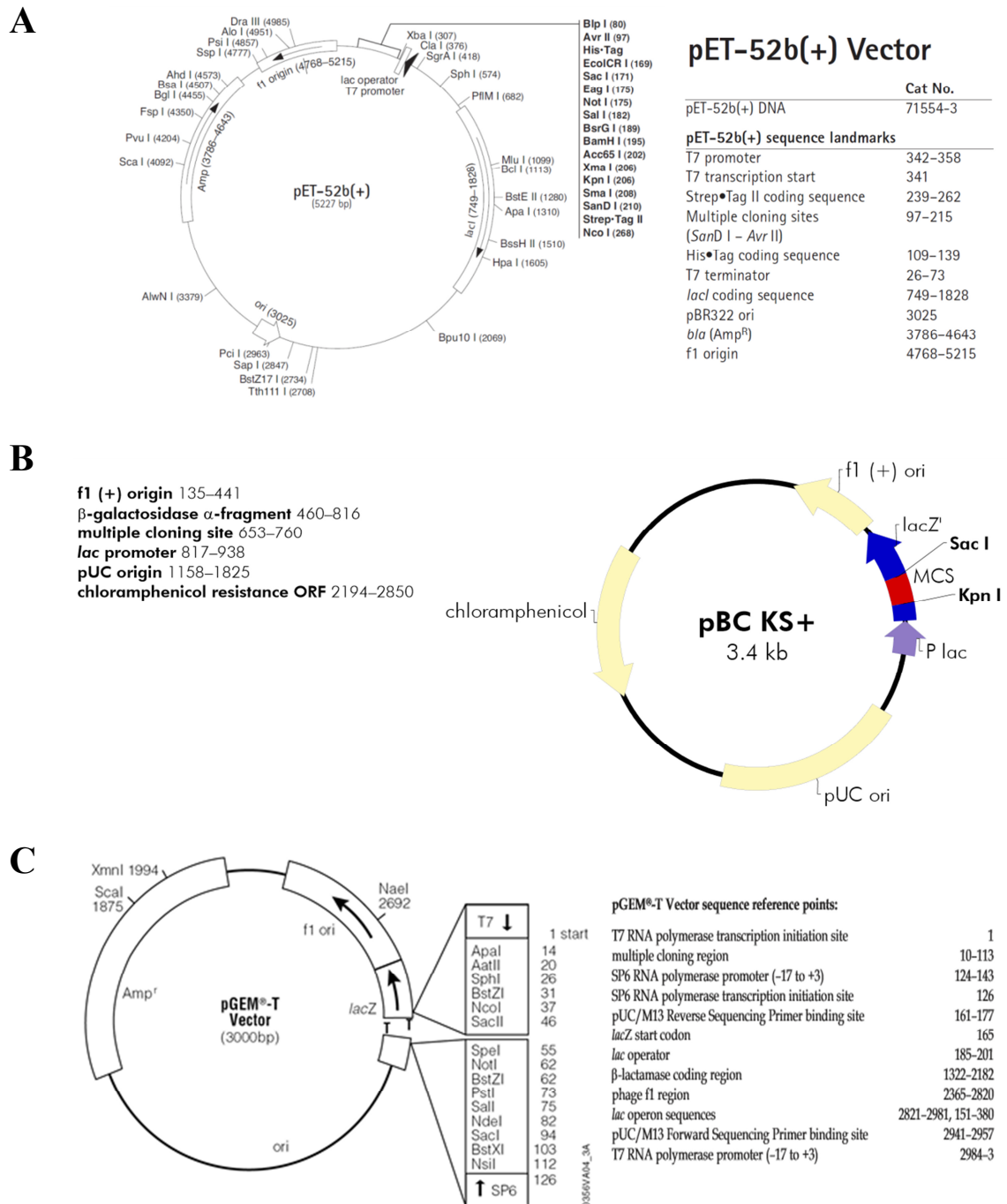


Abbildung 13: Vektorkarten verwendeter Vektoren

(A) Vektorkarte pET-52b(+) (www.novagen.de). (B) Vektorkarte pBC KS (+) (www.genomics.agilent.com). (C) Vektorkarte pGEM®-T (www.promega.de)

Tabelle 7: Verwendete Primer

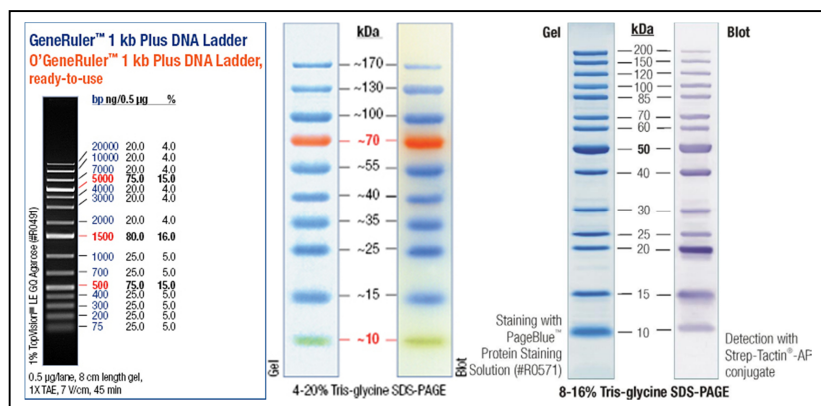
Name	Sequenz	Annealing
PpiB_UFF	ATTCCTGGCATTAACGCGTG	59,5 °C
PpiB_UFR_	GTTTCCCGTTGAATATGGCTCATCATGGATGTAG	59,9 °C
Kan	AAATTAAAACCATATT	
PpiB_DFF_	ATTTGATGCTCGATGAGTTTTTCTAAGAGGTTAG	59,2 °C
Kan	AGAACTGGCTTAG	
PpiB_DFR	CCTGCGACAAATAGTATTGCAG	60,3 °C
PpiB_UFF_	TTGGGGAGCAGGGGATTGT	59,5 °C
Seq		
PpiB_DFR_	GAGCAAAGCTCATAAGGAAGC	59,5 °C
Seq		
PpiB_F1	CATGAGCTCCTGATGATTTGGCACCTGTTATG	60,9 °C
PpiB_R1	AAGGTACCAGGAAGATCCCTCTTCCATACT	60,1 °C
PpiB_for	TTT AAT TTC TAC ATC CAT GGG TGA TA	60,1 °C
UFR_Sm	TTGATTTGCTCGTATGTGTTTCATCATGGATGTAG	59,9 °C
	AAATTAAAACCATATT	
DFF_Sm	TGAACAACAGGTTGAAGAAATTATAAGAGGTTA	59,2 °C
	GAGAACTGGCTTAG	
UFR_Cm	TCCAGTGATTTTTTTCTCCATCATGGATGTAGAA	59,9 °C
	ATTAAAACCATATT	
DFF_Cm	CAGGGCGGGGCGTAAGAGGTTAGAGAACTGGCT	59,2 °C
	TAG	
Cm_F	ATGGAGAAAAAAATCACTGGA	53,4 °C
Cm_R	TTACGCCCCGCCCTG	54,2 °C
Cm_inv_5	TCTGGTTATAGGTACATTGAGCAA (bindet 5')	60,3 °C
Cm_inv_3	GCTGATGCCGCTGGCGAT (bindet 3')	60,8 °C
PpiB_F2	ACCCGGGATGGTTTTAATTTCTACATCCATGG	59,2 °C
(Prod.)		
PpiB_R2	CATGAGCTCCTAAGCCAGTTCTCTAACCTCAA	60,9 °C
(Prod.)		
PpiB_F1_2	GGTGAACATATGGTTTTAATTTCTACATCCATGG	59,2 °C
(comp.)		

PpiB_R1_2 (comp.)	ATTCTCTAGAAGGAAGATCCCTCTTCCATACT	60,1 °C
2560_UFF	ATTCAAGGCAGTTATTGCATTTA	56,0 °C
2560_UFR	CCCGTTGAATATGGCTCATGACATCCCTTTTTATT ATTATTATTT	55,0 °C
2560_DFF	GATGCTCGATGAGTTTTTCTAAGGATACGCAATG AAGAAGTTA	55,0 °C
2560_DFR	GGTTGGGTTTCCAGCCC	57,0 °C
2560_UFF2	CCTCAAGTAGTCAACAAAATCATTC	61,0 °C
2560_DFR2	AGATGGTTCCGTTATTCCGACA	61,0 °C
2560_F1	CATGAGCTCTTCCATCCTTTGGTGGCATAT	60,0 °C
2560_R1	AAGGTACCTTACTTATAATTCCTTGATCAAAAC G	60,0 °C
2560_R1_2	ATTCTCTAGATTACTTATAATTCCTTGATCAAAA CG	59,2 °C
2560_R2	CATGAGCTCTTACTTATAATTCCTTGATCAAAA CG	59,2 °C
2560_R1_3	TATTCCTCGAGTTACTTATAATTCCTTGATCAAA ACG	51,5 °C
2560_F2	ACC CGG GAT GAG AATTACATTACTTACAACAGC	59,2 °C
LpC_0801_ UFF	CGCTACTTCTTCTAAAATTAATGAG	59,0 °C
LpC_0801_ UFR	GTTTCCCGTTGAATATGGCTCATGATTTATTGTCC TTATTTT TAGAGTCT	59,0 °C
LpC_0801_ DFF	TTTGATGCTCGATGAGTTTTTCTAAATAATAAAA AAATTGCTTGATTGAGATAATC	60,0 °C
LpC_0801_ DFR	ATGAGACAAGTTATATTAGATACCG	60,0 °C
LpC_0801_ UFF2	CTATAGTAAAATTGACATGCCCTAC	61,0 °C
LpC_0801_ DFR2	GAGTTGGTTAAAAATGCGGAATTATG	61,7 °C

0801_F1 (comp.)	CATGAGCTCTTCAAATATTCCATCACCTTTATGC	59,2 °C
0801_R1 (comp.)	AAGGTACCCTATTTGGGAATTAGATGTTTTTCAG	60,1 °C
0801_F2 (Prod.)	ACCCGGGATGTCAAGGAAATTACTTATTGCTAC	60,1 °C
0801_R2 (Prod.)	CATGAGCTCCTATTTGGGAATTAGATGTTTTTCA G	60,1 °C
M13_For	GTAAAACGACGGCCAGT	52,4 °C
M13_Rev	GGAAACAGCTATGACCATG	55,2 °C
Mip_fw	GGGRATTVTTTATGAAGATGARAYTGG	56,0 °C
Mip_rev	TCRTTNGGDCCDATNGGNCCDCC	56,0 °C

Tabelle 8: Verwendete Restriktionsenzyme

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
<i>Sac I</i>	Schittstelle GAGCT/C, Quelle: <i>E. coli</i> Stamm mit dem <i>sacI</i> -Gen von <i>Streptomyces achromogenes</i>	NEB (R0156S)
<i>Kpn I</i>	Schittstelle GGTAC/C, Quelle: <i>E. coli</i> Stamm mit dem <i>kpnI</i> -Gen von <i>Klebsiella pneumoniae</i>	NEB (R0142S)
<i>Sma I</i>	Schittstelle CCC/GGG, Quelle: <i>E. coli</i> Stamm mit dem <i>smaI</i> -Gen von <i>Serratia marcescens</i>	NEB (R0141S)

Abbildung 14: Verwendete Protein und DNA-Marker Quelle: www.fermentas.de

Als Marker für die Größenbestimmung von DNA-Fragmenten wurde die Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder von Fermentas verwendet. Für Proteine wurden entweder die Page Ruler Prestained Protein Ladder #SM0672 oder die Unstained Protein Ladder #SM0661 von Fermentas eingesetzt (Abb. 14).

Tabelle 9: Verwendete Antikörper

Bezeichnung	Beschreibung	Referenzen
Mouse anti-His Antikörper	IgG2a; bindet an Histidin-reiche Sequenzen	GE Healthcare
Mouse anti-Mip Antikörper 2D8	IgG1; bindet an <i>L. pneumophila</i> Mip	(J H Helbig <i>et al.</i> , 1995)
Rabbit anti-L.p. Antikörper	Polyklonal, für Serogruppe 1-12	www.Antikörper-online.de
Mouse anti-M6S Antikörper	Bindet an Mannose-6-Sulfat von lysosomalen Enzymen von <i>D. discoideum</i>	(Neuhaus <i>et al.</i> , 1998)
LAMP-1 Antikörper	Lysosomal-associated membrane protein 1 (mouse anti-Human)	Santa Cruz
Anti-Strep Antikörper	<i>Strep</i> -Tactin® horse radish peroxidase (HRP) Konjugat für Western blot	Iba
Goat anti-Mouse AP Antikörper	IgG, bindet an den Fc-Teil von Maus-IgGs, gekoppelt mit alkalischer Phosphatase	Thermo Scientific
Goat anti-Rabbit AP Antikörper	IgG, bindet an den Fc-Teil von Rabbit-IgGs, gekoppelt mit alkalischer Phosphatase	Thermo Scientific
Goat anti-Mouse A488 Antikörper	Alexa-488-konjugierter Anti-Maus IgG	Invitrogen

Die für Wachstums- und Infektionsanalysen verwendeten Cycloheximidderivate MT_30.3, MT_30.8, MT_30.9, MT_30.32, MT_30.38, MT_30.51, MT_30.79, MT_30.92 und MT_30.93 (Tab.10) wurden im Rahmen eines Kooperationsprojekts freundlicherweise von Martin Theuerkorn synthetisiert und von Dr. Matthias Weiwad zur Verfügung gestellt. Beide Kooperationspartner sind Mitarbeiter der Universität Halle, Abteilung Enzymologie.

Tabelle 10: Verwendete Cycloheximid-Derivate (Rasch *et al.*, 2015)

Substanz	Struktur
MT_30.3	
MT_30.8	
MT_30.9	
MT_30.32	
MT_30.38	
MT_30.51	
MT_30.79	
MT_30.92	
MT_30.93	

4.4 Bakteriologische Methoden

4.4.1 Kultur von Bakterien

L. pneumophila Corby und seine Mutanten wurden auf „Buffered Charcoal Yeast Extract“-Agarplatten (BCYE) bei 37 °C und 5 % CO₂ für drei bis vier Tage kultiviert. Flüssigkulturen wurden in „Yeast Extract Broth“-Flüssigmedium (YEB) bei 37 °C und 200 rpm kultiviert. Wenn nötig wurden die Medien mit 25 µg/ ml Kanamycin oder 12,5 µg/ ml Chloramphenicol versetzt.

„Yeast Extract Broth“-Flüssigmedium (YEB)		
10 g	ACES	GERBU
10 g	Hefeextrakt (Bacto™)	BD
	auf 900 ml mit MilliQ auffüllen	
	pH Wert auf 6,9 mit 10 M KOH einstellen	
	auf 1 l mit MilliQ auffüllen	
0,4 g	Cystein in 10 ml MilliQ vorlösen	
0,25 g	Eisenpyrophosphat in 10 ml MilliQ vorlösen	
	Cystein und Eisenpyrophosphat zum Medium geben	
	mit „On-Top-Bottle-Filter“ (0,2 µm Porengröße) sterilfiltrieren	
„Buffered Charcoal Yeast Extract“-Agar (BCYE)		
5 g	ACES	GERBU
10 g	Hefeextrakt (Bacto™)	BD
	auf 900 ml mit MilliQ auffüllen	
	pH Wert auf 6,9 mit 10 M KOH einstellen	
	auf 1 l mit MilliQ auffüllen	
2 g	Aktivkohle	Fluka
15 g	Agar	
	autoklavieren und nach Abkühlung auf ~50 °C	
0,4 g	Cystein in 10 ml MilliQ gelöst und sterilfiltriert	
10 ml	sterile Fe(NO) ₃ x 9 H ₂ O Lösung (25 g/l)	
	zugeben und in Petrischalen gießen	

Die verwendeten *E. coli*-Stämme wurden auf LB-Agarplatten bei 37 °C und 5 % CO₂ für einen Tag kultiviert. Für Flüssigkulturen wurden die Bakterien in flüssiges LB-Medium überführt und für 24 h bei 37 °C, 200 rpm angezogen. LB-Agar und Flüssigmedium wurden ggf. mit 100 µg/ml Ampicillin versetzt.

LB-Medium

10 g	Caseinpepton
5 g	Hefeextrakt
5 g	Natriumchlorid
(15 g	Agar)
Auf 1 l mit MilliQ auffüllen und autoklavieren	

Für die Proteinproduktion in *E. coli* wurde DYT Medium verwendet und mit 10-200 µM IPTG induziert. Die Produktionskulturen wurden je nach Protein bei 17 °C, 25 °C oder 37 °C über Nacht bei 200 rpm geschüttelt.

DYT-Medium

16 g	Trypton
10 g	Hefeextrakt
5 g	Natriumchlorid
(15 g	Agar)
pH 7 einstellen, auf 1 l mit MilliQ auffüllen und autoklavieren	

4.4.2 Kryokonservierung von Bakterien

Der Bakterienrasen einer bewachsenen Agarplatte wurde mit 1 ml sterilem PBS abgespült und in ein Kryoröhrchen überführt. Dazu wurden 600 µl 100 % Glycerin hinzugegeben und das Röhrchen bei -80 °C konserviert. Bei Bedarf wurde etwas Bakterienmaterial mit der ausgeglühten Impföse entnommen und auf einer Agarplatte mit oder ohne Antibiotikum ausgestrichen und inkubiert.

4.4.3 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Von dem *E. coli*-Stamm DH10 β wurde eine LB-Übernachtskultur angezogen. Nach 24 h wurden 2,5 ml der bewachsenen Kultur mit 250 ml LB-Medium und 20 mM MgSO₄ bis zu einer OD von 0,4-0,7 inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension 5 min bei 4000-6000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 0,4 Volumen des Überstandes in eiskaltem TFB-1-Puffer resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 5-10 min auf Eis wurden die Zellen für 5 min bei 4000-6000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde vorsichtig mit 1/25 Volumen der Ausgangskultur mit eiskaltem TFB-2-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen 15-60 min auf Eis inkubiert und dann in 100-200 μ l Aliquots bei -80 °C gelagert. Nach einer Lagerung von drei Monaten nahm die Kompetenz der Zellen ab.

TFB-1

30 mM	Kaliumacetat
10 mM	CaCl ₂
50 mM	MnCl ₂
100 mM	RbCl
15 %	Glycerin (v/v)
	mit 1 M Essigsäure pH 5,8 einstellen
	sterilfiltrieren (0,2 μ m Porengröße), Lagerung bei 4 °C

TFB-2

10 mM	MOPS oder PIPES
75 mM	CaCl ₂
10 mM	RbCl
15 %	Glycerin (v/v)
	mit 1 M KOH pH 6,5 einstellen
	sterilfiltrieren (0,2 μ m Porengröße), Lagerung bei 4 °C

4.5 Zellbiologische Methoden

4.5.1 Kultivierung von *Acanthamoeba castellanii*

4.5.1.1 Anzucht von *A. castellanii*

Die Kultivierung von *A. castellanii* erfolgte in 20 ml PYG-Medium in 75 cm² Zellkulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO₂. Wenn nach 2-3 Tagen die adhärent wachsenden Zellen konfluent waren, konnten sie für Experimente verwendet oder gesplittet werden. Beim Splitten wurden die Acanthamöben durch das Aufklopfen der Zellkulturflasche auf den Tischrand vom Boden gelöst. Von der Zellsuspension wurden 2 ml in eine neue Zellkulturflasche überführt, mit 18 ml PYG-Medium verdünnt und inkubiert.

PYG-Medium		
20 g	Proteose Pepton	BD
1 g	Hefeextrakt	BD
1 g	Na ₃ -Citrat	
10 ml	MgSO ₄ (einer 0,4 M Stocklösung)	
10 ml	Na ₂ HPO ₄ (einer 0,25 M Stocklösung)	
10 ml	KH ₂ PO ₄ (einer 0,25 M Stocklösung)	
8 ml	CaCl ₂ (einer 0,05 M Stocklösung)	
	auf 940 ml mit MilliQ auffüllen, autoklavieren	
18 g	Glukose	
	in 50 ml MilliQ lösen, autoklavieren, dann zur Lösung geben	
10 ml	(NH ₄)FeII(SO ₄) ₂ (0,005 M)	
	nach Abkühlen des Mediums sterilfiltriert dazugeben	

4.5.1.2 Kryokonservierung von *A. castellanii*

Für die Konservierung von *A. castellanii* wurde eine konfluent bewachsene 75 cm² Zellkulturflasche abgeklopft und die Zellsuspension für 5 min bei 233 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml PYG-Medium resuspendiert und die Zellzahl auf 1 x 10⁶ Zellen/ml mit Kryokonservierungsmedium eingestellt. Die Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen überführt und über Nacht in einem mit Isopropanol gefüllten Nalgene Cryo 1C Freezing Container bei -80 °C gelagert. Die langfristige Lagerung der Zellen konnte sowohl bei -80 °C als auch in flüssigem Stickstoff erfolgen.

Konservierungsmedium für *A. castellanii*

90 %	PYG-Medium
10 %	DMSO (v/v)
	sterilfiltrieren (0,2 µm Filter)

Für die Reanimation von *A. castellanii* wurden die Kryoröhrchen vorsichtig in einem 37 °C Wasserbad aufgetaut und die Zellsuspension in 8 ml PYG-Medium aufgenommen. Nach 5 minütiger Zentrifugation bei 233 x g wurde das Pellet in 10 ml PYG-Medium resuspendiert und in eine 25 cm² Zellkulturflasche überführt und inkubiert. Die erste Anzucht in einer kleineren Zellkulturflasche begünstigte das Anwachsen nach der Konservierung.

4.5.2 Kultivierung von *Dictyostelium discoideum*

4.5.2.1 Anzucht von *D. discoideum*

Die Anzucht von *D. discoideum* erfolgte in einer mit 20 ml HL5-Medium befüllten 75 cm² Zellkulturflasche bei 21 °C. War diese Flasche konfluent mit adhärenenten Zellen bewachsen, wurde sie für 2 Wochen bei 4 °C gelagert. Von dieser Ausgangskultur konnten mit einer 1:10 Verdünnung in HL5-Medium Kulturen für Assays in 75 cm² Zellkulturflaschen oder in 100 ml Erlenmeyerkolben bei 180 rpm angezogen werden.

HL 5-Medium		
14,3 g	Neutralized Bacteriological Peptone	Oxoid
7,15 g	Hefeextrakt (Bacto™)	Dicfo
0,64 g	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	
0,49 g	KH ₂ PO ₄	
18 g	Maltose	
Mit 10 N KOH auf pH 6,9-7,1 einstellen, mit MilliQ auf 1 L auffüllen und sterilfiltrieren (0,2 µm)		

4.5.2.2 Kryokonservierung *D. discoideum*

Für die Konservierung von *D. discoideum* wird eine 10 ml Vorkultur angesetzt und nach dreitägiger Inkubation bei 230 x g für 7 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellzahl in 1 x Soerensenpuffer auf 1×10^7 Zellen/ml eingestellt. Von dieser Suspension wurden 400 µl auf eine Soerensenagarplatte pipettiert und durch schwenken verteilt. Nach einer dreitägigen Inkubation in einer feuchten Kammer bei 21 °C bildeten sich Sporenköpfe. Diese wurden mit 2 ml Soerensenpuffer von der Platte abgespült, auf Kryoröhrchen verteilt und direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren.

50 x Soerensenpuffer	
99,86 g	KH ₂ PO ₄
17,8 g	Na ₂ HPO ₄
mit MilliQ auf 1 L auffüllen und autoklavieren	
Zur Herstellung von Soerensenagar wurden zu einem Liter 1 x Soerensenpuffer 15 g Agar hinzugefügt und autoklaviert	

Für die Reanimation von *D. discoideum* wurde das Kryoröhrchen in der Hand aufgetaut und der Inhalt in eine 75 cm² Zellkulturflasche mit 10 ml HL5-Medium überführt. Nach einer Inkubation von 2-4 Tagen bei 21 °C konnte die Kultur für weitere Zwecke verwendet werden.

4.5.3 Kultivierung von THP-1 Makrophagen

4.5.3.1 Anzucht von THP-1 Zellen

Die THP-1 Zelllinie wurde in 20 ml RPMI1640 (PAA E15-817) + 10 % FCS (PAA A15-101) + 2 mM L-Glutamin (RPMI-Medium) in 75 cm² Zellkulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Wenn die Zellsuspension nach 2-3 Tagen dicht bewachsen war, konnte sie für Versuche verwendet oder gesplittet werden. Beim Splitten wurden 2 ml der Zellsuspension abgenommen, mit 18 ml RPMI-Medium in eine neue 75 cm² Zellkulturflasche überführt und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

4.5.3.2 Kryokonservierung von THP-1 Zellen

Zur Konservierung wurde eine dicht bewachsene Zellsuspension aus einer 75 cm² Zellkulturflasche entnommen und für 10 min bei 100 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 2 ml Konservierungsmedium resuspendiert und die Zellsuspension wird in ein Kryoröhrchen überführt.

Die Röhrchen wurden über Nacht in einem mit Isopropanol gefüllten Nalgene Cryo 1C Freezing Container bei -80 °C gelagert. Am nächsten Tag wurden die Röhrchen aus dem Container entnommen und in flüssigem Stickstoff gelagert.

Konservierungsmedium für Zelllinien

80 %	RPMI1640 + 10 % FCS + 2 mM L-Glutamin
10 %	Zusätzliches hitzeinaktiviertes FCS (v/v)
10 %	DMSO oder Glycerin (v/v)
	sterilfiltrieren (0,2 µm Filter)

Bei Bedarf wurden die Kryoröhrchen zunächst aus dem Stickstofftank entnommen und auf Eis zwischengelagert. Dann wurde das Röhrchen in einem 37 °C Wasserbad vorsichtig aufgetaut. Anschließend wurde der Inhalt des Kryoröhrchens in ein mit 8 ml Medium befülltes 50 ml Falcon gegeben und 5 min bei 100 x g zentrifugiert. Das Pellet

wurde in 20 ml RPMI-Medium resuspendiert und die Zellen in einer 75 cm² Zellkulturflasche bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

4.5.3.3 Ausdifferenzieren von THP-1 Zellen

Für die Verwendung im Infektionsassay wurden die THP-1 Makrophagen 48 h vor der Durchführung ausdifferenziert. Dazu wurden die konfluent gewachsenen Zellen für 5 min bei 100 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in frischem RPMI-Medium resuspendiert und die Zellzahl mit RPMI-Medium auf eine Zellzahl von 5×10^5 Zellen/ml eingestellt. Pro Milliliter Zellsuspension wurden 100 nM Phorbol-Myristat-Acetat (PMA) zugegeben. In eine 96-Wellplatte wurden pro Well 100 µl der Zellsuspension pipettiert. Die Makrophagen wurden 48 h bei 37 °C und 5 % CO₂ ausdifferenziert.

4.5.3.4 Zytotoxizitätsassay

Für die Untersuchung der Cycloheximid-Derivate auf Zytotoxizität wurde Alamar blue (Biozol) eingesetzt. Zuerst wurden konfluent bewachsene THP1-Makrophagen auf eine Zellzahl von 3×10^5 / ml in RPMI + 10 % FCS eingestellt. Dann wurden die Zellen unter Zugabe von 10 nmol PMA für 48 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit (Standardbedingungen) ausdifferenziert. Dafür wurden 96-Wellplatten mit einem Volumen von 200 µl/ Well verwendet. Nach dem Ausdifferenzieren wurden die Zellen einmal mit 200 µl warmem RPMI + 10 % FCS gewaschen. Anschließend wurden die Makrophagen mit 100 µM Substanz in RPMI + 10 % FCS für 20 h bei Standardbedingungen inkubiert. Schließlich wurde Alamar blue 1:1 mit Medium verdünnt und je 50 µl zu den Zellen gegeben. Es folgte ein weiterer Inkubationsschritt für 5 h unter Standardbedingungen und die anschließende Bestimmung der OD₅₉₅.

4.6 Infektionsbiologische Methoden

4.6.1 Infektionen in *A. castellanii*

Für die Infektion von *A. castellanii* wurde eine konfluent bewachsene Kultur verwendet. Die adhären gewachsenen Zellen wurden durch Aufklopfen auf den Tischrand vom Boden der Zellkulturflasche gelöst. Dann wurde die Suspension 5 min bei $233 \times g$ zentrifugiert und die Zellzahl mit Amöbenpuffer auf 5×10^5 Zellen/ml eingestellt. Je 5 ml dieser Suspension wurden in 25 cm^2 Zellkulturflaschen überführt und 30-60 min bei 37°C inkubiert, damit die Zellen erneut adhärieren konnten. Die Bakterien wurden nach 3-4 tägiger Kultivierung auf BCYE-Agarplatten mit $1 \times \text{PBS}$ abgespült und auf eine Zellzahl von 1×10^6 cfu/ml eingestellt. Anschließend wurden die Amöben durch Zugabe von $50 \mu\text{l}$ der eingestellten Bakteriensuspension infiziert. Bei der geringen MOI (Multiplicity of Infection) von 0,02 wurde angenommen, dass jedes Bakterium von einer Wirtszelle aufgenommen wurde. Daher wurde auf eine Antibiotikabehandlung zur Abtötung nach 2 h verzichtet. Die Infektion von *A. castellanii* erfolgte über 48 h bei 37°C . Nach 2, 24 und 48 h wurden die Amöben durch Abklopfen von der Zellkulturflasche gelöst und je $200 \mu\text{l}$ in 2 ml Eppendorfgefäße überführt. Es folgten die Zentrifugation bei $20.000 \times g$ für 5 min und das Vortexen für ca. 15 sec. Dann wurden verschiedene Verdünnungen in ddH_2O hergestellt, auf BCYE-Agar ausplattiert und die Platten 3-4 Tage bei 37°C inkubiert.

Amöbenpuffer

1 g	$\text{Na}_3\text{-Citrat}$
10 ml	MgSO_4 (0,4 M)
10 ml	Na_2HPO_4 (0,25 M)
10 ml	KH_2PO_4 (0,25 M)
	auf 990 ml mit MilliQ auffüllen, autoklavieren und nach Abkühlen hinzufügen
10 ml	$(\text{NH}_4)\text{FeII}(\text{SO}_4)_2$ (0,005 M)
	nach Abkühlen des Mediums steriltriftriert dazugeben

4.6.2 Kolokalisationsstudien in *D. discoideum*

Für die Durchführung der Infektion wurden 24-Well-Platten verwendet, in die je ein steriles, rundes Deckgläschen pro Well platziert wurde. Die Bakterien wurden zu Beginn mit Rhodamin markiert. Dafür wurden 3 d alte Legionellen mit sterilem 1 x PBS von der Platte abgespült und mit 1 x PBS auf 1×10^9 cfu/ ml eingestellt. Die Bakterien wurden 5 min bei $2000 \times g$ zentrifugiert und erneut in 1 x PBS resuspendiert. Dieser Waschvorgang wurde noch zweimal wiederholt. Dann wurden 10 µl Rhodamin (30 mM in DMSO) zugegeben und die Suspension 30 min bei 300 rpm im Dunkeln geschüttelt. Zum Entfernen des überflüssigen Farbstoffs wurden die Bakterien viermal mit je 1 ml 50 mM Tris-HCl pH 7,5 gewaschen. Zuletzt wurden die gefärbten Legionellen in 1 ml 1 x Soerensenpuffer aufgenommen. Der Wirtsorganismus *D. discoideum* AX₂ wurde für 3 d bei 25 °C und 180 rpm kultiviert. Die Zellen wurden bei $233 \times g$ für 5 min zentrifugiert und auf 4×10^5 Zellen/ ml in Infektionsmedium (HL5 und 1 x Soerensenpuffer, 1:1) eingestellt. Davon wurden 500 µl in die vorbereiteten 24-Well Platten ausgesät. Die Zellen wurden für 30-60 min bei 25 °C inkubiert, um Adhärenz zu ermöglichen. Anschließend wurde das alte Infektionsmedium erneuert und 40 µl (MOI 100) der zuvor mit Rhodamin markierten Legionellen hinzugegeben. Der Infektionsansatz wurde durch Zentrifugation für 5 min bei $233 \times g$ synchronisiert und anschließend zweimal mit Infektionsmedium gewaschen. Nach vierstündiger Inkubationszeit wurden die infizierten Zellen dreimal mit 500 µl kaltem SorC-Puffer (1 x Soerensenpuffer + 40 µM CaCl₂) gewaschen und mit -20 °C kaltem Methanol für 30 min fixiert. Daraufhin wurden die Zellen erneut dreimal mit kaltem SorC-Puffer gewaschen. Auf Parafilm wurden 30-40 µl des primären Antikörpers (1:1000) aufgetropft und die Deckgläser mit der Zellseite nach unten für ein bis zwei Stunden auf den Tropfen gelegt. Anschließend wurden die Deckgläser dreimal mit 500 µl Blocking-Puffer gewaschen und mit 2 µg/ ml des Sekundärantikörpers Alexa Fluor 488 (goat anti-mouse IgG, Invitrogen) für eine Stunde bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 500 µl Blocking-Puffer wurde die DNA mit 1 µg/ ml DAPI in 1 x PBS markiert und darauffolgend zweimal mit 1 x PBS gewaschen. Zum Schluss wurden die Deckgläser mit der Zellseite nach unten mit DAKO Mountingmedium über Nacht im Dunkeln auf Objektträgern fixiert.

Die so präparierten Proben wurden mit einem konfokalen Breitbandmikroskop untersucht. Die Quantifizierung der Kolo-kalisation der Phagosomen mit den Lysosomen wurde anschließend mit dem Programm ImageJ durchgeführt. Hierzu wurden die Bilder ins 8-bit Format transformiert (Image → Color → Split Channels). Dann wurde der rote Kanal aktiviert und der Schwellenwert eingestellt (Image → Adjust → Threshold). Anschließend wurde eingestellt welche Parameter gemessen werden sollen (Analyze → Set Measurements), indem „Integrated density“, „Limit to Threshold“, „Area“, und „Redirect to green“ ausgewählt wurden. Nun wurde der Rand einer Bakterienzelle mit dem „Wand tracing tool“ umrandet und gemessen (Analyze → Measure). Insgesamt wurden 100 Bakterien in jedem der drei biologischen Replikate vermessen. Für die Ermittlung der „lysosomal marker association“ wurden die gemessenen „integrated Density“-Werte durch die „Area“-Werte geteilt. Der Mittelwert (mit SEM) wurde anschließend mit GraphPad Prism 5 dargestellt.

4.6.3 Infektionen in THP-1 Makrophagen

Für die Durchführung eines Infektionsassays wurden in 96-Wellplatten ausdifferenzierte THP-1 Makrophagen verwendet. Dazu wurden 3 d alte Legionellen mit 1 x PBS von einer BCYE-Platte abgespült und auf 1×10^6 Bakterien/ ml in RPMI + 10 % FCS eingestellt. Die ausdifferenzierten Makrophagen wurden mit warmen RPMI + 10 % FCS gewaschen und dann mit je 100 µl Bakteriensuspension (MOI 1) infiziert. Die Bakterien wurden für 2 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit mit den Zellen inkubiert. Danach wurde der Ansatz dreimal mit 200 µl warmen RPMI + 10 % FCS gewaschen. Beim dritten Waschschrift können dem Medium Substanzen oder Sekretome hinzugefügt werden. Im weiteren Verlauf wurden die 24 h und 48 h-Werte ausplattiert, indem in jedes Well 50 µl steriles 1 % Triton X-100 in 1 x PBS gegeben wurden. Der durch Triton X-100 hervorgerufene Lyseprozess der Makrophagen, wurde durch mehrmaliges auf- und abpipettieren unterstützt. Anschließend wurden verschiedene Verdünnungsstufen in ddH₂O eingestellt, auf BCYE-Agar ausplattiert und die Platten für 3-4 d bei 37 °C inkubiert.

4.6.4 Infektionen in HLTEs

Das explantierte, humane Lungengewebe stammte von Krebspatienten, denen aufgrund eines Lungenkarzinoms ein Teil der Lunge entnommen wurde. Das Gewebe wurde unfixiert und gekühlt in die Pathologie gebracht und dort wurde der Tumor zur weiteren Untersuchung entnommen (Abbildung 15).

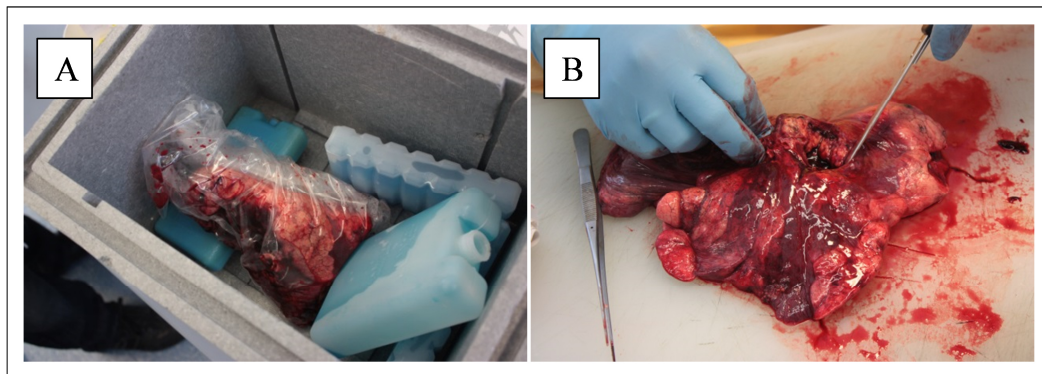


Abbildung 15: Explantiertes Lungengewebe (A) Das explantierte Lungengewebe wurde unfixiert und gekühlt in die Pathologie geliefert. (B) Tumorgewebe wurde vermessen und für weitere Analysen aus dem Lungengewebe entfernt.

Lungeninfektionsmedium

500 ml	RPMI1640
50 ml	hitzeinaktiviertes FCS (v/v)
5 ml	200 mM L-Glutamin
10 ml	1 M HEPES
5 ml	100 mM Na-Pyruvat

Für unsere Versuche wurde ein tumorfreies Stück vom Rand entnommen. Im Labor wurde das Gewebe mit einem Skalpell in kleine Stücke mit einem Gewicht von ungefähr 0,1 g geschnitten und mit einer Pinzette in Lungenmedium überführt.

Für die Infektion wurden 3 d alte Legionellen mit 1 x PBS von einer BCYE-Platte abgespült und auf 1×10^7 cfu/ ml in Lungeninfektionsmedium eingestellt. Anschließend wurden 2 ml der Suspension pro Well aliquotiert und ein Lungenstück dazugegeben.

Für die Bestimmung der CFU wurde das Gewebe nach 2, 24 und 48 h mit einer sterilen Pinzette aus der Bakteriensuspension entnommen und in ein mit 3 ml sterilem dH₂O befülltes Röhrchen (Röhre 13 ml, Sarstedt) überführt (Abbildung 16).

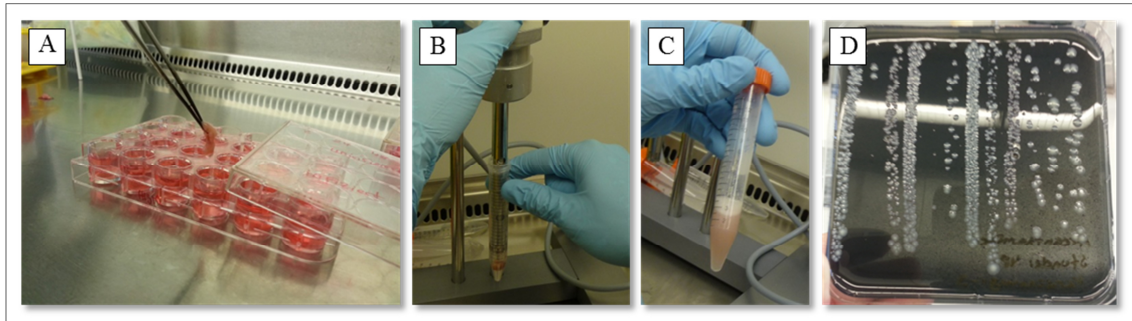


Abbildung 16: Verarbeitung von infiziertem Lungengewebe für die Bestimmung der CFU. (A) Die infizierten Lungenstücke wurden aus der 24-Well-Platte entnommen und in ein Röhrchen überführt, das mit 3 ml sterilem dH₂O befüllt war. (B+C) Die Lungenstücke wurden homogenisiert. (D) Die Suspension wurde in sterilem 1 x PBS verdünnt und auf BCYE-Platten ausplattiert.

Nach der Homogenisierung des Gewebes wurden verschiedene Verdünnungsstufen auf BCYE-Agar ausplattiert und inkubiert.

Für die Durchführung von histologischen Analysen wurden die Lungenstücke nach 2, 24 und 48 h über Nacht in Röhrchen und befüllt mit 10 ml HOPE-Lösung fixiert (Abbildung 17).

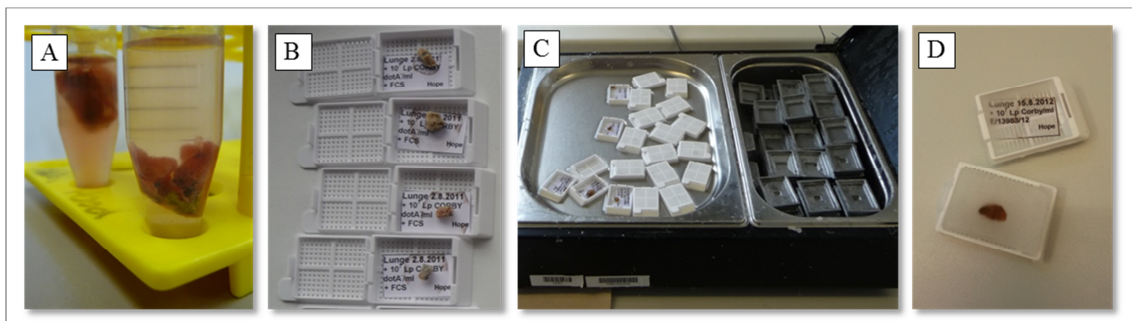


Abbildung 17: Verarbeitung von infiziertem Lungengewebe für histologische Untersuchungen. (A) Die infizierten Lungenstücke wurden über Nacht in HOPE-Lösung fixiert und danach 6 h in Aceton dehydriert. (B) Die Lungenstücke wurden in Plastikkassetten überführt und dann über Nacht bei 56 °C in flüssigem Paraffin inkubiert. (C+D) Aus den Gewebestücken wurden Paraffinblöcke gegossen, mit denen Schnitte für Färbungen hergestellt werden können.

Anschließend wurde das Gewebe über 6 h in Aceton dehydriert, wobei stündlich das Aceton erneuert wird. Die entwässerten Proben wurden über Nacht in einer Plastikkassette in flüssigem Paraffin bei 56 °C inkubiert, damit im Anschluss Paraffinblöcke gegossen werden konnten. Aus den Blöcken wurden Schnitte

angefertigt, die mittels HE- oder Immunfärbung angefärbt und mikroskopisch untersucht werden.

Alle histologischen Untersuchungen wurden von Dr. Sebastian Marwitz am Institut für klinische und experimentelle Pathologie im Forschungszentrum Borstel durchgeführt.

4.6.5 *Caenorhabditis elegans*

4.6.5.1 Anzucht von *C. elegans*

Für die Kultivierung von *C. elegans* wurde aus einer älteren, mit Würmern beimpften NGM-Agarplatte, in der sich die Nematoden bereits eingegraben hatten, ein Stück ausgestochen und auf eine neue, mit *E. coli* OP 50 bewachsene Platte überführt. Nach 3-4 Tagen bei 16-21 °C konnten L4-Larven mit Hilfe eines Spatels auf eine neue Platte überführt und für Experimente verwendet werden.

NGM-Agar	
3 g	NaCl
2,5 g	Pepton
1 ml	Cholesterol (5 mg/ml in Ethanol)
17 g	Agar
	+ 975 ml dH ₂ O, autoklavieren und nach Abkühlen hinzufügen
1 ml	1 M CaCl ₂
1 ml	1 M MgSO ₄
25 ml	1 M Kaliumphosphat pH 6

4.6.5.2 Quantifizierung der *C. elegans*-Kolonisierung durch Legionellen

Der Modellorganismus *C. elegans* wurde verwendet, um Kolonisierung verschiedener Legionellenstämme im Darm zu quantifizieren. Dafür wurden neu ausgeschwärmte L4-Larven des N2-Wildtyp-Stammes auf mit Legionellen bewachsene kleine BCYE-Agarplatten (3,5 cm Durchmesser) umgesetzt und bei 25 °C in einer feuchten Kammer

inkubiert. Als Kontrolle wurden einige Würmer auf mit *E. coli* OP50 bewachsene LB-Agarplatten (3,5 cm Durchmesser) überführt und inkubiert. Es wurden für Experimente mit *C. elegans* Nährböden mit doppelten Agarkonzentrationen verwendet. Das erschwerte es den Würmern, sich in den Agar einzugraben. Des Weiteren wurde den BCYE-Platten Ampicillin beigelegt, damit Kontaminationen mit anderen Bakterien ausgeschlossen werden konnten. Nach 24 und 48 h wurden 30 Würmer pro Platte in je 600 µl eiskalten M9-Puffer überführt und für 30 s bei 3000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die Nematoden wurden noch zwei weitere Male mit je 500 µl eiskaltem M9-Puffer gewaschen und dann in 100 µg/ ml Gentamicin in M9-Puffer für 10 min auf Eis inkubiert, um außen anliegende Legionellen abzutöten. Es erfolgten weitere drei Waschschriffe mit je 500 µl eiskaltem M9-Puffer. Der Überstand des letzten Waschschriffes wurde in verschiedenen Verdünnungsstufen auf BCYE-Agarplatten ausplattiert. Die Würmer wurden in 250 µl eiskaltem M9-Puffer aufgenommen und 200 µl steriles MilliQ mit 0,5 mm Glasperlen hinzugefügt. Die Homogenisierung der Würmer erfolgte durch einminütiges vortexen. Der Überstand wurde in verschiedenen Verdünnungen auf BCYE-Agarplatten ausplattiert und inkubiert. Nach Auszählen der Platten wurde die errechnete Keimzahl des Überstandes vom letzten Waschschriff von der des Wurmlysats subtrahiert, um die am Wurm außen anliegenden Legionellen rauszurechnen.

M9-Puffer

3 g KH₂PO₄6 g Na₂HPO₄

0,5 g NaCl

1 g NH₄ClAuf 1 l mit dH₂O auffüllen und autoklavieren

4.6.6 Survival-Assays in *C. elegans*

Für die Durchführung von Survival-Assays wurden neu ausgeschwärmte L4-Larven des N2-Wildtyp-Stammes auf mit Legionellen bewachsene BCYE-Agarplatten (3,5 cm Durchmesser) umgesetzt und bei 25 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Als

Kontrolle wurden einige Würmer auf mit *E. coli* OP50 bewachsene LB-Agarplatten überführt und inkubiert. Ab dann wurden alle 24 h die Anzahl der lebenden und der toten Würmer bestimmt. Eine Nematode galt als tot, wenn sie bei Berührung mit dem Spatel keine Reaktion zeigte und wenn das Pumpen des Pharynx nicht mehr festgestellt werden konnte. Nematoden, die durch Eingraben im Agar verschwanden, wurden von den Berechnungen ausgeschlossen. An Tag 2 bis 5 wurden die Würmer auf frische Legionellen- oder *E. coli* OP50-Platten umgesetzt, um Kontaminationen durch andere Larvenstadien zu verhindern. Für die Bestimmung der Überlebensrate wurde ein Graph nach Kaplan-Meier erstellt.

4.6.7 Trojan-Horse-Infektion

Um herauszufinden, ob Legionellen auch indirekt in den Darm von Nematoden gelangen können, wurde eine Trojan-Horse-Infektion durchgeführt. Dafür wurde *A. castellanii* mit *L. pneumophila* mCherry unter Zusatz von 500 μ M IPTG und 12,5 μ g Chloramphenicol infiziert. Für die Infektion von wurde eine konfluent bewachsene Kultur verwendet. Die adhären gewachsenen Zellen wurden durch Aufklopfen auf den Tischrand vom Boden der Zellkulturflasche gelöst werden. Dann wurde die Suspension 5 min bei 233 x g zentrifugiert und die Zellzahl mit Amöbenpuffer auf 5×10^5 Zellen/ml eingestellt. Je 5 ml dieser Suspension wurden in 25 cm² Zellkulturflaschen überführt und 30-60 min bei 37 °C inkubiert, damit die Zellen adhäreren konnten. Die Bakterien wurden nach 3-4 tägiger Kultivierung auf BCYE-Agarplatten mit 1 x PBS abgespült und auf eine Zellzahl von 1×10^8 Zellen/ml eingestellt. Anschließend wurden die Amöben durch Zugabe von 50 μ l der eingestellten Bakteriensuspension infiziert (MOI 2). Nach 2 h wurde der Überstand abgenommen und die Zellen mit 100 μ g/ ml Gentamicin in Amöbenpuffer für 45 min bei 37 °C inkubiert, um nicht phagozytierte Legionellen abzutöten. Nach zweimaligem Waschen mit Amöbenpuffer wurden die Amöben der ersten Flasche mit 4 ml Amöbenpuffer abgeklopft. Die Suspension wurde in eine weitere gewaschene Amöbenflasche gegeben, bei der zuvor der Puffer abgenommen wurde. Auch diese Amöben wurden abgeklopft, sodass die Amöbenkonzentration im Puffer immer weiter stieg. Insgesamt wurden 4 Flaschen mit den gleichen 4 ml Amöbenpuffer abgeklopft. Von der hoch

konzentrierten Amöbensuspension wurde 1 ml in ein Eppi überführt und 100 µl Calcoflour dazugegeben. Anschließend wurde die Suspension 10 min bei 233 x g zentrifugiert und das Pellet in 1 ml Amöbenpuffer resuspendiert. Als nächstes wurden 100 µl der Amöbensuspension auf eine kleine M9-Agarplatte (3,5 cm Durchmesser) aufgetropft und trocknen gelassen. Danach wurden ca. 20 L4-Larven des N2-Wildtyp-Stammes auf die Agarplatte überführt und über Nacht bei RT inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Nematoden in eine 12-Well Ibidi-Kammer überführt, mit 4 % PFA fixiert und am Fluoreszenzmikroskop fotografiert.

4.6.8 Infektion von natürlichen Biofilmen

Die natürlichen Biofilme, die in dieser Arbeit untersucht wurden, stammen aus der Soufre Quelle in Aix-les Bains, Frankreich und wurden von Prof. Dr. Dominique Fontvieille und Aurelie Labrosse von der Universite de Savoie bereitgestellt.

Für die Infektion wurde der Stamm *L. pneumophila* Corby mCherry nach 3-4 tägiger Kultivierung auf BCYE-Agarplatten mit sterilem 1 x PBS abgewaschen und auf eine Zellzahl von 1×10^9 cfu/ml eingestellt. Von der Bakteriensuspension wurden 500 µl in eine Petrischale pipettiert, die ca. 10 ml Biofilm enthält. Nach 24-stündiger Inkubation bei RT und im Dunkeln wurden alle Bewohner des Biofilms in 8-Well Platten von Ibidi überführt, mit 4 % PFA fixiert und am Fluoreszenzmikroskop mikroskopiert.

4.7 Mikrobiologische Methoden

4.7.1 Sliding Motility

Für die Analyse der Sliding Motility wurde der Assay nach Stewart *et al.* 2009 durchgeführt. Dafür wurden Vorkulturen verschiedener Legionellenstämme angesetzt und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Bei $OD_{600}=3$ wurden von jeder Kultur 10 µl pro BCYE-Motilityplatte aufgetropft und trocknen gelassen. Die BCYE-Motilityplatten durften nicht älter als 24 h sein, da die Austrocknung sonst zu stark

fortgeschritten war. Der Ansatz wurde nun bei 30 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach 7, 14 und 21 d wurden die Platten fotografiert. Die Größe der Kolonien und des Tensidfilms wurden mit dem Programm „Adobe Photoshop 7.1“ ausgewertet, indem die gemessenen Pixel mit der Fläche der Petrischale in Verhältnis gesetzt wurden.

BCYE-Motilityagar		
5 g	ACES	GERBU
10 g	Hefeextrakt (Bacto™)	BD
	auf 900 ml mit MilliQ auffüllen	
	pH Wert auf 6,9 mit 10 M KOH einstellen	
	auf 1 l mit MilliQ auffüllen	
2 g	Aktivkohle	Fluka
5 g	Agar	
	autoklavieren und nach Abkühlung auf ~50 °C	
0,4 g	Cystein in 10 ml MilliQ gelöst und sterilfiltriert	
10 ml	sterile Fe(NO) ₃ x 9 H ₂ O Lösung (25 g/l)	
	zugeben und in Petrischalen gießen	

4.7.2 Temperaturwachstum

Für die Analyse des Temperatur-abhängigen Wachstums von Legionellen wurden Vorkulturen verschiedener Legionellenstämmen angesetzt und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Sobald sich die Kulturen in der stationären Phase befanden, wurden sie auf eine Zellzahl von 1×10^8 cfu/ ml eingestellt und in Zehnerschritten bis zu einer Verdünnungsstufe von 1×10^{-6} in sterilem 1x PBS verdünnt. Die Verdünnungsreihe wurde auf BCYE-Agarplatten ausplattiert und trocknen gelassen. Die Platten mit den Bakterien wurden bei 17 °C, 37°C und 44°C in feuchten Kammern inkubiert. Das Wachstum der Bakterien wurde in regelmäßigen Abständen kontrolliert und fotografiert.

4.7.3 Minimale Hemmkonzentration

Die minimale Hemmkonzentration (MHK) ist die geringste Konzentration eines Wirkstoffes, bei dem das Wachstum der Bakterien noch gehemmt wird. In dieser Arbeit wurden Cycloheximid-Derivate hinsichtlich ihres Einflusses auf das Legionellen-Wachstum getestet. Für die Durchführung des Versuchs wurden Vorkulturen verschiedener Legionellenstämme angesetzt und bei 37 °C und 200 rpm bis zur stationären Phase kultiviert. Anschließend wurde die Zellzahl auf 2×10^7 cfu/ ml in YEB eingestellt und je 100 µl der Suspension in eine 96-Well-Platte überführt. Die Substanzen wurden auf eine Konzentration von 200 µM in YEB eingestellt. In die vorgelegte Bakteriensuspension wurden in aufsteigenden Zehnerschritten 0-100 µl Derivat pro Well hinzugefügt. Anschließend wurden alle Wells auf ein Volumen von 200 µl mit YEB aufgefüllt. Die Legionellen hatten eine Endkonzentration von 1×10^7 cfu/ Well. Der Ansatz wurde bei 37 °C und 180 rpm kultiviert und nach 2 d wird die OD₆₀₀ bestimmt.

4.8 Molekularbiologische Methoden

4.8.1 Isolation der genomischen DNA

Aus einer *L. pneumophila* Corby WT Flüssigkultur wurde die genomische DNA mittels Phenol-Chloroform-Fällung isoliert. Dazu wurden einige Milliliter einer *Legionella*-Vorkultur bei 18.000 x g für 3 min pelletiert. Das Pellet wurde in TNE-Puffer resuspendiert und 3 min bei 16.000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in Mix 1 resuspendiert und die Suspension für 30 min bei 37 °C inkubiert. Dem Lysat wurden 20 µl Proteinase K (20 mg/ml) zugefügt. Nach zweistündiger Inkubation bei 65 °C wurden 500 µl Chloroform/ Isoamylalkohol (24:1 v/v) zugegeben und 15 min bei 1.000 rpm geschüttelt. Die Emulsion wurde 10 min bei 16.000 x g zentrifugiert. Zum Überstand wurden 0,5 Volumen 5 M NaCl und 2,5 Volumen Ethanol abs. hinzugefügt und für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit 70 % Ethanol und einmal mit Ethanol abs. gewaschen. Abschließend wurde das Pellet für 20 min getrocknet und mit 150 µl dH₂O resuspendiert.

TNE	
10 mM	Tris-HCl, pH 8
10 mM	NaCl
10 mM	EDTA
TNEX	
99 %	TNE
1 %	Triton X-100
Mix 1	
1,95 ml	TNEX
0,05 ml	Lysozym (20 mg/ml)

4.8.2 Herstellung von *L. pneumophila* Deletionskonstrukten

Die Herstellung von *L. pneumophila* Deletionsmutanten erfolgte über homologe Rekombination. Dafür wurde zu Beginn das Deletionskonstrukt mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion (PCR) hergestellt. Der erste Schritt war der Entwurf von geeigneten Oligonukleotidsequenzen (Primern). Damit die homologe Rekombination begünstigt wurde, brauchte das Deletionskonstrukt flankierende Regionen mit einer Größe von ca. 1-1,5 kb in jede Richtung. An den Enden der flankierenden Regionen wurden die Primer UFF (*upstream flanking forward*) und DFR (*downstream flanking reverse*) entworfen, die möglichst zwischen zwei Genen liegen sollten.

An den Enden des GOI (*gene of interest*) wurden die Primer UFR (*upstream flanking reverse*) und DFF (*downstream flanking forward*) entworfen. Der Primer UFR hatte an seinem 3'-Ende einen Überhang, der an den 5'-Bereich des Kanamycin-Resistenzgens *nptI* (oder des Chloramphenicol-Resistenzgens *cat*) band. Ein Überhang, der an das 3'-Ende des Resistenzgens band, war im Primer DFF eingebaut. Die entworfenen Primer wurden bei biomers.net bestellt. Dann wurden mit Hilfe mehrerer PCRs von der

genomischen DNA als Template die beiden flankierenden Regionen und von einem Vektor als Template die Kanamycinresistenz (Chloramphenicolresistenz) als Produkt hergestellt.

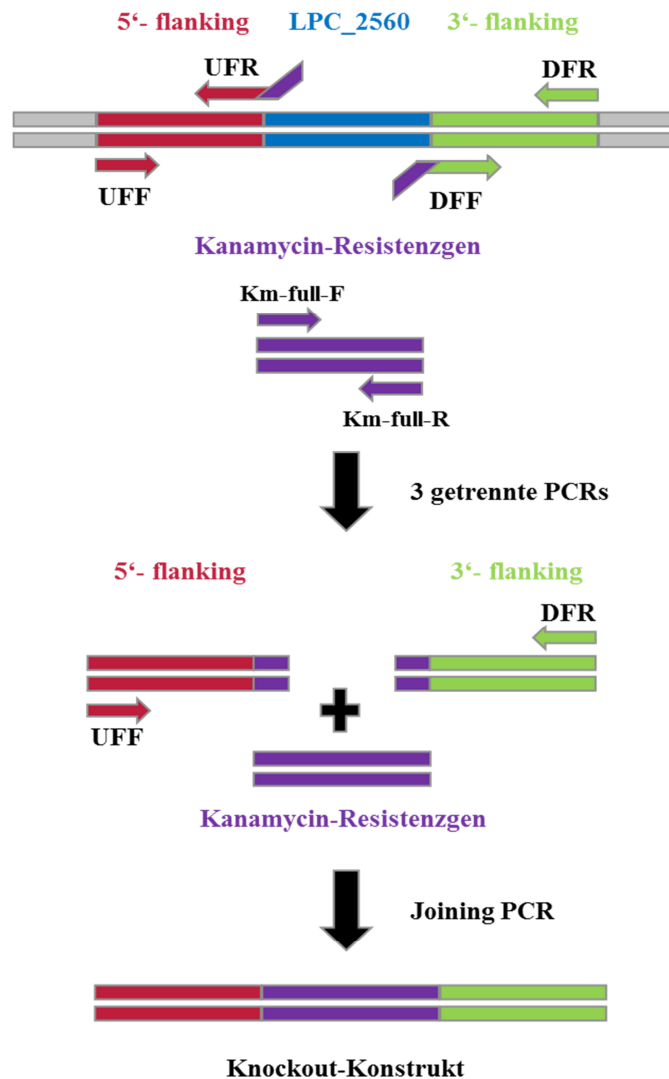


Abbildung 18: Schema zur Herstellung des Deletionskonstrukts. Zu Beginn wurden drei Konstrukte amplifiziert: der 5'-flankierende Bereich mit den Primern UFF und UFR (rot), der 3'-flankierende Bereich mit den Primern DFF und DFR (grün) und die Resistenzkassette mit den entsprechenden Primern (lila). In der Joining-PCR wurde aus diesen drei Fragmenten das vollständige Deletionskonstrukt mit den Primern UFF (rot) und UFR (grün) amplifiziert. *Quelle: (Tran, 2013)*

Nach der Aufreinigung der PCR-Produkte mit dem Qiagen PCR Purification Kit nach Herstellerprotokoll wurde eine sogenannte Joining-PCR durchgeführt. Dafür wurden die drei Einzelfragmente 5' Flanke, Resistenzkassette, 3' Flanke im Verhältnis 1:3:1 als Template und UFF und DFR als Primer verwendet. Durch die Überhänge der

flankierenden Regionen kam es während der PCR zu einer Verbindung aller drei Konstrukte zu einem Deletionskonstrukt.

Ansatz für eine 50 µl PCR-Reaktion mit Q5-Polymerase

10 µl	5 x Q5-Reaktion-Buffer
1 µl	10 mM dNTPs
2,5 µl	10 µM forward Primer
2,5 µl	10 µM reverse Primer
1 µl	Template DNA
0,5 µl	Q5 High-Fidelity DNA Polymerase
32,5 µl	MilliQ

PCR Programm

Deckel vorheizen auf 110 °C

98 °C 30 sek

35 x { 98 °C 10 sek
63 °C 10 sek
72 °C 45 sek

72 °C 2 min

4 °C Pause

Ansatz für die Adenosin-Addition

5 µl	2 mM dATP
0,2 µl	Taq-Polymerase
5 µl	10 x Thermopol-Puffer
40 µl	DNA

Das Produkt der Joining-PCR wurde aus dem 1 %igen Agarosegel ausgeschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) aufgereinigt und in 40 µl dH₂O eluiert. Anschließend wurde das Produkt für eine AT-Klonierung mit Adeninüberhängen versehen, indem es für 20 min bei 70 °C mit der Taq-Polymerase in Gegenwart von dATP inkubiert wurde.

Nach der Adenosin Addition wurde das pGEM®-T easy Kit (Promega) dazu verwendet, das Deletionskonstrukt mit den A-Überhängen mit dem Vektor pGEM®-T mit T-Überhängen zu verbinden. Die Ligation fand für 10 min bei RT statt. Der komplette Ligationsansatz wurde in CaCl₂-kompetente *E. coli* DH10β transformiert.

Ansatz für Ligation

1	μl	pGEM®-T Plasmid (10-100 ng)
x	μl	Deletionskonstrukt im Verhältnis 1:3 zum Vektor
4	μl	5 x Rapid Ligation Buffer
1	μl	Ligase
auf 19 μl mit dH ₂ O auffüllen		

4.8.3 Transformation von chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen

Für die Transformation wurden 20 μl des Deletionskonstrukts vorgelegt und 50 μl kompetente Zellen dazugegeben. Es folgte eine Inkubation für 20 min auf Eis. Anschließend wurde ein Hitzeschock für 45 sek bei 42 °C durchgeführt und die Zellen dann sofort auf Eis überführt. Nach zweiminütiger Inkubation wurde 1 ml LB-Medium hinzugefügt und der Ansatz für 1 h bei 300 rpm und 37 °C inkubiert. Je 10, 50 und 100 μl der Kultur wurden auf LB-Agarplatten mit Ampicillin (100 μg/ ml), IPTG (500 μM) und 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal; 80 μg/ ml) ausplattiert und ü.N. 37 °C inkubiert. Durch die Zugabe von Antibiotikum wuchsen nur Bakterien auf der Agarplatte, die ein Plasmid enthielten. Durch die Zugabe von IPTG und X-Gal konnte eine Blau-Weiß-Selektion durchgeführt werden. Wurde das Insert in das Plasmid einer Bakterienzelle aufgenommen, wurde das *lacZ*-Gen, welches für die β-Galaktosidase codiert, unterbrochen und die Kolonie erschien weiß. War kein Insert vorhanden, konnte durch die β-Galaktosidase X-Gal in den blauen Farbstoff 5,5'-Dibromo-4,4'-Dichloro-Indigo und Galaktose spalten. In diesem Fall erschienen die Kolonien blau.

4.8.4 Herstellung von *L. pneumophila* Deletionsmutanten

Ob die weißen Kolonien der *E. coli*-Transformation tatsächlich den Vektor mit inseriertem Konstrukt enthielten, wurde mit Hilfe einer Kolonie-PCR überprüft. Dafür wurde mit einer Pipettenspitze etwas Bakterienmaterial von der Kolonie abgenommen und in 100 µl MilliQ 5 min bei 95 °C aufgekocht. Durch das Aufkochen wurde die DNA der Bakterienzellen freigesetzt und diese wird als Template für eine PCR verwendet.

Ansatz für eine 25 µl PCR-Reaktion mit Taq-Polymerase

2,5	µl	10 x Thermopol-Puffer
0,5	µl	10 mM dNTPs
1,25	µl	10 µM forward Primer
1,25	µl	10 µM reverse Primer
1	µl	Template DNA
0,2	µl	Taq DNA Polymerase
18,3	µl	MilliQ

PCR Programm

Deckel vorheizen auf 110 °C

95 °C 30 sek

35 x { 95 °C 15 sek
52 °C 30 sek
68 °C 60 sek

68 °C 5 min

4 °C Pause

Erwies sich einer der überprüften Klone als positiv, wurde dieser in 2 ml LB + 100 µg/ml Ampicillin ü.N. bei 200 rpm und 37 °C kultiviert. Am nächsten Tag wurde die Bakterienkultur bei 8000 rpm für 5 min zentrifugiert und aus dem Pellet die Plasmide mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) aufgereinigt. Das Plasmid

wurde zur Sequenzierung zu GATC-biotech geschickt und die Sequenzen der flankierenden Regionen mit den Originalsequenzen verglichen. Stimmten die Sequenzen überein, wurde die Plasmid DNA als Template für eine PCR mit Q5-Polymerase (siehe Kapitel 4.8.2) mit den Primern UFF und DFR verwendet.

Für die Transformation der Legionellen wurde eine Vorkultur in 30 ml YEB angesetzt und bei 30 °C und 180 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 bis 1,0 kultiviert. Davon wurde 1 ml in ein steriles 2 ml Eppendorfgefäß aliquotiert und 2-4 µg des aufgereinigten PCR-Produktes hinzugefügt. Der Ansatz wurde 3 d stehend bei 30 °C inkubiert und dann auf BCYE-Platten ausplattiert, auf denen zuvor das benötigte Antibiotikum ausgespatelt wurde (Kanamycin 17,5 µg/ ml, Chloramphenicol 10 µg/ ml). Nach 5-6 d waren bei erfolgreicher Transformation Kolonien zu sehen, die mit einer Kolonie-PCR nach Protokoll überprüft wurden.

4.8.5 Komplementation von *L. pneumophila* Deletionsmutanten

Für die Komplementation der Deletionsmutanten wurden zunächst Primer entworfen, die an das GOI banden. Der Forward-Primer trug eine *KpnI*-Schnittstelle am 5'-Ende und hybridisierte ca. 300 bp vor dem Startcodon, um den natürlichen Promotor mit einzuschließen. Der Reverse-Primer hatte eine *SacI* Schnittstelle am 3'-Ende und band an das Ende des Gens. Die Primer wurden bei biomers.net bestellt. Mit Hilfe einer Q5-Polymerasen-PCR (siehe Kapitel 4.8.2) mit der genomischen DNA als Template wurde das GOI amplifiziert.

Das amplifizierte Produkt wurde mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt. Anschließend wurden die DNA und der Vektor pBC KS (+) mit den Restriktionsenzymen *KpnI* und *SacI* für 1 h bei 37 °C verdaut. Gleichzeitig wurde der Vektor mit Hilfe einer Phosphatase dephosphoryliert.

Ansatz für Restriktionsverdau des Inserts mit *KpnI* und *SacI*

8 µl	MilliQ
6 µl	CutSmart Puffer
3 µl	<i>KpnI</i>
3 µl	<i>SacI</i>
28 µl	DNA

Ansatz für Restriktionsverdau und Dephosphorylierung des Vektors

30 µl	MilliQ
5 µl	CutSmart Puffer
1,5 µl	<i>KpnI</i>
1,5 µl	<i>SacI</i>
2 µl	Antarctic Phosphatase (NEB)
10 µl	DNA

Die Restriktionsansätze wurden mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt. Anschließend wurden Vektor und Insert im Verhältnis 1:8 ligiert.

Ansatz für Ligation

1 µl	pGEM®-T Plasmid (10-100 ng)
x µl	Deletionskonstrukt im Verhältnis 1:3 zum Vektor
4 µl	5 x Rapid Ligation Buffer
1 µl	Ligase
	auf 19 µl mit dH ₂ O auffüllen

Das ligierte Konstrukt wurde wie in Kapitel 4.8.3 beschrieben in *E. coli* DH10 β transformiert. Nach erfolgreicher Identifizierung eines positiven Klons mittels Kolonie-PCR wurde dieser in 2 ml LB + 100 µg/ ml kultiviert und die Plamid DNA mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) aufgereinigt.

4.8.6 Transformation von *L. pneumophila* mittels Elektroporation

Für die Transformation von Legionellen durch Elektroporation wurde zunächst eine Legionellen-Vorkultur in 35 ml YEB angesetzt und bei 30 °C und 180 rpm ü.N. kultiviert. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 1,5 - 2,0 wurden 100 µl der Bakterienkultur auf einer BCYE-Agarplatte ausplattiert. Nach einer Kultivierung ü.N. bei 37 °C war ein Bakterienrasen zu sehen, der mit 1 ml eiskaltem 10 % Glycerol ab gespült wurde. Die

Bakterien wurden dreimal bei 6000 x g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert und mit je 1 ml eiskaltem 10 % Glycerol gewaschen. Für die Elektroporation wurden 50 µl der Bakteriensuspension in eine vorgekühlte 2 mm-Elektroporationsküvette vorgelegt und 2 µl DNA hinzugegeben. Die Bakterien und die DNA werden durch vorsichtiges Umrühren mit einer Pipettenspitze vermischt und bei 100 Ω, 25 µF und 2,5 kV elektroporiert. Danach wurde sofort 1 ml YEB in die Elektroporationsküvette pipettiert, die Suspension in ein Eppendorfgefäß überführt und ü.N. bei 37 °C und 300 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Legionellen auf BCYE-Agar ausplattiert, auf dem zuvor 10 µg/ml Chloramphenicol ausgespaltet wurden. Nach einer Inkubationszeit von 3 d bei 37 °C waren bei erfolgreicher Transformation Kolonien zu sehen und konnten durch eine Kolonie-PCR auf das Tragen des Komplementationsplasmids überprüft werden.

4.8.7 Klonierung von *Legionella*-Genen für die rekombinante Produktion

Für die Produktion von Proteinen aus *L. pneumophila* werden Produktionsplasmide hergestellt und in *E. coli* eingebracht. Dafür wurden im ersten Schritt Primer entworfen, die mit dem GOI hybridisieren und Schnittstellen für *SmaI* und *SacI* besitzen. Mit Hilfe einer Q5-Polymerasen-PCR (siehe Kapitel 4.8.2) wurde das GOI amplifiziert und das Produkt mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt.

Der Vektor pET-52b (+) wurde aus einer *E. coli*-Vorkultur mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) aufgereinigt. Anschließend wurde das Insert und Vektor mit den Restriktionsenzymen *SmaI* und *SacI* 1 h bei 37 °C verdaut. Gleichzeitig wurde der Vektor dephosphoryliert.

Ansatz für Restriktionsverdau des Inserts mit *SmaI* und *SacI*

8 µl	MilliQ
6 µl	CutSmart Puffer
3 µl	<i>SmaI</i>
3 µl	<i>SacI</i>
28 µl	DNA

Ansatz für Restriktionsverdau und Dephosphorylierung des Vektors

30	µl	MilliQ
5	µl	CutSmart Puffer
1,5	µl	<i>SmaI</i>
1,5	µl	<i>SacI</i>
2	µl	Antarctic Phosphatase
10	µl	DNA

Nach der Restriktion wurden Vektor und Insert mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt und wie in Kapitel 4.8.4 beschrieben ligiert.

Ansatz für Ligation

1	µl	pGEM®-T Plasmid (10-100 ng)
x	µl	Deletionskonstrukt im Verhältnis 1:3 zum Vektor
4	µl	5 x Rapid Ligation Buffer
1	µl	Ligase
auf 19 µl mit dH ₂ O auffüllen		

Der komplette Ligationsansatz wurde wie in Kapitel 4.8.3. beschrieben in kompetente *E.coli*-DH10β transformiert und positive Klone selektioniert. Die Klone wurden mit Hilfe einer Kolonie-PCR mit Taq-Polymerase (siehe Kapitel 4.8.4) überprüft, indem etwas Koloniematerial in 100 µl dH₂O für 5 min bei 95 °C aufgeköcht und als Template verwendet wurde.

Ein Klon, der sowohl Plasmid als auch Insert trug, wird in 2 ml LB + 100 µg/ ml Ampicillin ü.N. bei 37 °C und 200 rpm kultiviert. Mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) wurde die Plasmid-DNA isoliert und zur Überprüfung zum Sequenzieren zu GATC-biotech geschickt. Stimmt die Sequenz des Gens mit der Ausgangssequenz überein, wurde das Plasmid in kompetente *E. coli* BL21 gebracht. Auch hier wurde wie in Kapitel 4.8.3 beschrieben vorgegangen. Ein mit Hilfe einer Kolonie-PCR positiv getesteter Klon wurde für die Produktion des klonierten Proteins verwendet.

4.9 Proteinbiochemische Methoden

4.9.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentration von Proteinlösungen wurde mittels Roti-Nanoquant (Roth K880.1) bestimmt. Die Proteinprobe wurde 1:5 mit der Roti-Nanoquant-Arbeitslösung verdünnt und mit einem Photometer der Quotient $OD_{590/450}$ bestimmt. Die Konzentration wurde in Bezug auf eine BSA-Eichreihe errechnet.

4.9.2 Aufkonzentration von Proteinen durch TCA-Fällung

Von den zu analysierenden *L. pneumophila*-Stämmen wurden in 50 ml YEB-Medium Vorkulturen angesetzt und bis zur stationären Phase bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Aus der stationären Kultur wurde eine Hauptkultur mit einer Start- OD_{600} von 0,05 inokuliert. Bei einer OD_{600} von ca. 3,0 wurden 250 ml Kultur je Stamm nach gleicher Inkubationsdauer in Falcons überführt und bei 5000 x g bei 4 °C für 15 min abzentrifugiert. Die Kulturüberstände wurden mit einer Porengröße von 0,2 µm sterilfiltriert und mit Roti-Nanoquant vermessen. In Falcons wurden zu 45 ml sterilem Kulturüberstand 5 ml 100 % Trichloressigsäure (TCA) pipettiert und so die Proteine über Nacht bei 4 °C gefällt. Die Proteine wurden bei 8000 x g für 1 h bei 4°C pelletiert. Anschließend wurden alle Pellets eines Stammes in insgesamt 10 ml eiskaltem absolutem Ethanol resuspendiert und erneut für 20 min bei 8000 x g und 4 °C pelletiert. Das Pellet wurde in 2 ml eiskaltem EtOH abs. resuspendiert und in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt. Die Proteine wurden erneut bei 12.000 x g und 4 °C pelletiert. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Abschließend wird das Proteinpellet einmal mit eiskaltem 70 %igen EtOH gewaschen und über Nacht bei 4 °C getrocknet. Das Pellet sollte nicht zu stark eintrocknen, da es sich sonst schlecht resuspendieren ließ. Es sollten dennoch keine Alkoholrückstände vorhanden sein. Die Proteine mussten während der gesamten Durchführung auf Eis oder bei 4 °C gelagert werden, um Proteasen zu inaktivieren.

4.9.3 Aufkonzentration von Proteinen mit dem Amicon®-System

Die *L. pneumophila*-Stämme der zu untersuchenden Sekretome wurden drei Tage vor Versuchsbeginn auf BCYE-Agar ausgestrichen und kultiviert. Anschließend wurden Vorkulturen in 50 ml YEB-Medium bis zu einer $OD_{600}=3,0$ bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde bei 8000 x g und 4 °C für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einem Filter (0,2 µm Porengröße) sterilfiltriert und 15 ml davon in ein Amicon®Ultra-15, Ultracel®-3K (Millipore) Röhrchen pipettiert. Das Röhrchen bestand aus einem Auffangbehälter, in dem ein Einsatz eingelegt war. Der Rand dieses Einsatzes bestand aus einer Filtermembran, die nur Proteine mit einem kleineren Molekulargewicht als 3 kDa durchließ. Das beladene Röhrchen wurde bei 5.000 x g und 4 °C für 1 h zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und es werden erneut 15 ml des sterilen Kulturüberstandes eingefüllt. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 5.000 x g und 4 °C für 1 h. Die Proteine lagen dann aufkonzentriert in ca 500 µl YEB-Medium vor und konnten in 1 ml sterilem PBS aufgenommen werden.

4.9.4 SDS-Gelelektrophorese

Für die Durchführung einer SDS-Gelelektrophorese wurden die Proteinproben 1:4 mit 4 x SDS-Ladepuffer verdünnt und bei 95 °C für 5 min aufgekocht. Anschließend wurde ein 12 %-iges SDS-Trenngel hergestellt, auf das ein 6 %-iges Sammelgel aufgeschichtet wurde. Das SDS-Gel wurde mit einem zweiten Gel oder einem „Buffer Dam“ in einen Schlitten eingespannt und in die Laufkammer gestellt. Schlitten und Laufkammer wurden jeweils bis zur Markierung mit 1 x SDS Laufpuffer gefüllt. Die Proteinproben wurden in die Taschen des Gels pipettiert. Für den Lauf wurde für ca. 45 min eine Stromstärke von 45 mA pro Gel angelegt. Das SDS-Gel wurde mit Coomassie Silver-Blue Färbelösung über Nacht angefärbt und danach mit Wasser entfärbt.

6 %iges Sammelgel

0,5 ml	Acrylamidlösung (30 %)
0,625 ml	Tris-HCl (0,5 M; pH 6,8)
1,375 ml	dH ₂ O
2,5 µl	TEMED
25 µl	APS (10 %)

12 %iges Trenngel

2 ml	Acrylamidlösung (30 %)
1,25 ml	Tris-HCl (1,5 M; pH 8,8)
1,75 ml	dH ₂ O
5 µl	TEMED
50 µl	APS (10 % w/v)

4 x Ladepuffer

300 mM	Tris-HCl pH 6,8
30 %	Glycerin (v/v)
15 %	β-Mercaptoethanol (v/v)
10 %	SDS (w/v)
0,2 %	Bromphenolblau (w/v)

SDS-Laufpuffer

25 mM	Tris
192 mM	Glycin
0,1 %	SDS (w/v)
der pH-Wert wird mit HCl auf 8,3 eingestellt	

Coomassie Silver-Blue

Färbelösung

100 ml	Aqua bidest.
100 ml	o-Phosphorsäure
100 g	Ammoniumsulfat
ad 800 ml	Aqua bidest.
1,2 g	Coomassie Brilliant Blue G 250
	vor Verwendung frisch dazugeben:
20 %	Methanol oder Ethanol abs.

4.9.5 Western Blot im Semi-Dry-Verfahren und Immunfärbung

Um spezifische Proteine mit Hilfe eines Antikörpers nachweisen zu können, wurden eine SDS-PAGE und ein Western Blot durchgeführt. Dazu wurden ein Stück PVDF-Membran und sechs Whatman-Papiere an die Größe des SDS-Gels angepasst. Die PVDF-Membran wurde kurz in Methanol aktiviert und anschließend mit dem SDS-Gel 10 min in Towbinpuffer äquilibriert. In die Kassette des Elektrobloppers wurden drei Towbinpuffer getränkte Whatman-Papiere aufgeschichtet und darauf die Membran, das Gel und drei weitere Whatman-Papiere gegeben. Alle Komponenten mussten luftblasenfrei aufeinandergelegt werden. Der Blotvorgang fand für 18 min bei 1 kV und 25 mA statt. Anschließend wurde die Membran 1 h in Blockingpuffer geschüttelt und ü.N. bei 4 °C in Waschpuffer mit verdünntem Primärantikörper inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Blot dreimal 10 min mit Waschpuffer gewaschen, damit alle nicht oder unspezifisch gebundenen Antikörper entfernt wurden. Dann wurde die Membran mit Sekundärantikörper 1:50.000 verdünnt mit Waschpuffer für 1 h schüttelnd inkubiert und erneut dreimal 10 min mit Waschpuffer gewaschen. Der Blot wurde mit 10 ml Alkalische Phosphatase-Puffer für 10 min äquilibriert. Dann wurden 33 µl BCIP (50 mg/ml in DMF) und 33 µl NBT (100 mg/ml in 70 % DMF) zu Alkalische Phosphatase-Puffer gegeben und der Blot damit entwickelt. Sobald Banden zu erkennen waren, wurde die Entwicklung mit dH₂O abgestoppt.

Blockingpuffer	
5,0 %	Magermilchpulver (w/v)
0,1 %	Tween 20 (v/v)
10,0 %	10 x PBS
Waschpuffer	
0,5 %	Magermilchpulver
0,1 %	Tween20
10,0 %	10 x PBS
Alkalische Phosphatase-Puffer	
100 mM	Tris pH 9,5
100 mM	NaCl
5 mM	MgCl ₂ x 6 H ₂ O

4.9.6 Shaving von Oberflächenproteinen

4.9.6.1 Isolierung von Proteinen der äußeren Membran mit Na₂CO₃

Von einer ü.N. kultivierten Bakterienkultur wurden 1,5 ml entnommen und bei 400 x g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1 ml 20 mM Tris-HCl, pH 7,2 gewaschen und in 200 µl 0,1 M NaCO₃, pH 11 resuspendiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension 30 min bei RT und 300 rpm geschüttelt. Nach erneuter Zentrifugation für 30 min bei 400 x g und 4 °C wurden die Proteine im Überstand für eine SDS-PAGE weiterverwendet.

4.9.6.2 Isolierung von Proteinen der äußeren Membran mit Harnstoff

Von einer ü.N. kultivierten Bakterienkultur wurden 1,5 ml entnommen und bei 400 x g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1 ml 20 mM Tris-HCl, pH 7,2

gewaschen und in 200 µl 1,8 M Harnstoff, 20 mM Tris-HCl, pH 7,2 resuspendiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension 30 min bei RT und 300 rpm geschüttelt. Nach erneuter Zentrifugation für 30 min bei 400 x g und 4 °C wurden die Proteine im Überstand für eine SDS-PAGE weiterverwendet.

4.9.6.3 Isolierung von Proteinen der äußeren Membran mit Triton X-100

Von einer ü.N. kultivierten Bakterienkultur wurden 1,5 ml entnommen und bei 400 x g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1 ml 20 mM Tris-HCl, pH 7,2 gewaschen und in 200 µl 1 % Triton X-100 resuspendiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension 30 min bei RT und 300 rpm geschüttelt. Nach erneuter Zentrifugation für 30 min bei 400 x g und 4 °C wurden die Proteine im Überstand für eine SDS-PAGE weiterverwendet.

4.9.6.4 von Proteinen der äußeren Membran mit 0,05 M NaAc-HCl

Von einer ü.N. kultivierten Bakterienkultur wurden 1,5 ml entnommen und bei 400 x g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1 ml 20 mM Tris-HCl, pH 7,2 gewaschen und in 200 µl 0,05 M NaAc-HCl, pH 5 resuspendiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension 30 min bei RT und 300 rpm geschüttelt. Nach erneuter Zentrifugation für 30 min bei 400 x g und 4 °C wurden die Proteine im Überstand für eine SDS-PAGE weiterverwendet.

4.9.7 Proteinexpression in *E. coli*

Für die rekombinante Expression eines Proteins in *E. coli* wurde zunächst eine Vorkultur des hergestellten Produktionsstammes (Kapitel 4.8.7) in DYT-Medium mit 100 µg/ ml Ampicillin bei 37 °C und 200 rpm kultiviert. Aus der Vorkultur wurde eine Hauptkultur 1:20 in DYT-Medium mit 100 µg/ ml Ampicillin angeimpft und 37 °C und 200 rpm inkubiert, bis sie eine $OD_{600} = 0,5-0,8$ erreicht hatte. Dann wurde die Expression des Proteins mit 50 µM IPTG induziert und die Kultur ü.N. bei 30 °C und 250 rpm weiter kultiviert.

DYT-Medium

16 g	Trypton
10 g	Hefeextrakt
5 g	NaCl
	pH-Wert mit NaOH auf 7,0 einstellen, autoklavieren
100 µg/ml	Ampicillin (frisch dazugeben)

Am nächsten Tag wurde die Produktionskultur bei 8000 x g und 4 °C für 30 min zentrifugiert, in 20 ml eiskaltem 1x PBS oder 20 mM Tris-HCl resuspendiert und mit Hilfe der French Press aufgeschlossen. Das Lysat wurde bei 20.000 x g und 4 °C für 1 h zentrifugiert. Die rekombinanten Proteine wurden im Anschluss mit einer Säulenchromatographie aus dem Überstand aufgereinigt.

4.9.8 Säulenchromatographie

Zur Aufreinigung von rekombinanten Proteinen wurde das Strep-tag® Starter Kit (ibafesciences) verwendet. Zunächst wurde die mit Streptavidin beladene Säule mit zwei Säulenvolumen (SV) Puffer W äquilibriert. Dann wurde die Proteinlösung über die Säule gegeben und das Säulenmaterial fünfmal mit je einem SV Puffer W gewaschen. Das rekombinante Protein band aufgrund des Strep-Tags am Säulenmaterial, während sich alle anderen Proteine im Durchfluss wiederfanden. Die Elution des Proteins erfolgte sechsmal mit je 0,5 SV Puffer E. Mit Hilfe einer SDS-PAGE wurde die Reinheit des eluierten Proteins überprüft. Das Säulenmaterial wurde zur Wiederverwendung dreimal mit je fünf SV Puffer R regeneriert und im Anschluss zweimal mit je vier SV Puffer W gewaschen. Bis zum erneuten Gebrauch wird das Säulenmaterial bei 4 °C in 2 ml Puffer W gelagert.

4.9.9 2D-Gelelektrophorese

Nach der Fällung der Sekretome mit TCA (Kapitel 4.9.3) wurden die Proteine in 200 µl Rehydratisierungspuffer A resuspendiert und 1 µl der Proteinlösung mit Roti-Nanoquant vermessen.

Rehydratisierungspuffer A

7,0 M	Harnstoff p.a.
2,0 M	Thioharnstoff p.a.
4,0 %	CHAPS (w/v)
50 mM	DTT
	in MilliQ, bei -20 °C lagern

Die Qualität der Proben wurde mit einer SDS-PAGE untersucht. Dazu wurden je Stamm 20 µg Proteinlösung verwendet. Das Gel wurde mit Coomassie Silver-Blue gefärbt.

Im nächsten Schritt folgte die Auftrennung der Proteine in der ersten Dimension nach ihrem pI-Wert mittels isoelektrischer Fokussierung (IEF). Von den Fällungsproben aus dem Kulturüberstand mit bekannter Proteinkonzentration wurden Probe und Rehydratisierungspuffer A so gemischt, dass in einem Endvolumen von 200 µl 350 µg Protein vorlag. Anschließend wurden 100 µl von Rehydratisierungspuffer B dazu pipettiert.

Rehydratisierungspuffer B

2,625 ml	Rehydratisierungspuffer A	
125,0 µl	Bio-Lyte® Ampholyte (pH 3-10)	BIO RAD 163-1112
1 Spatelspitze	Bromphenolblau	
	bei -20 °C lagern	

Die Rehydratisierungskammer wurde mit Baktolin gewaschen und dann sehr gründlich mit deion. Wasser nachgespült. Wenn die Kammer getrocknet war, wurden die vorbereiteten Proteinlösungen luftblasenfrei in die Vertiefungen der Rehydratisierungskammer pipettiert. Ein Gradientenstreifen (Ready Strip™ IPG Strip 17 cm, pH 3-10, BIO RAD) wurde mit zwei Pinzetten aus der Verpackung entnommen. Mit der einen Pinzette wurde der Streifen festgehalten und mit der Anderen die Schutzfolie entfernt. Der Streifen wurde mit der Gel-beschichteten Seite nach unten luftblasenfrei auf die Proteinprobe in der Rehydratisierungskammer aufgelegt und zum Schutz vor Verdunstung mit Mineralöl überschichtet. Die Proteine diffundierten ü.N. bei RT in das Gel der Streifen.

Zur Auftrennung der Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt wurden diese anschließend isoelektrisch fokussiert. Um den Stromfluss zu verbessern, wurden kleine, mit MilliQ befeuchtete Stückchen Whatman-Papier mit einer Pinzette auf den Elektrodendraht gelegt. Die mit Protein beladenen Streifen wurden mit der Gelseite nach unten auf die Whatman-Papiere aufgelegt. Dabei musste das mit einem „+“ gekennzeichnete Ende des Streifens an der Anode des Fokussierungsgerätes angelegt werden. Der Streifen wurde mit 3 ml Mineralöl beschichtet. Die Fokussierung erfolgte bei Raumtemperatur und einer maximalen Stromstärke von 50 μ A pro Gelstreifen. Die Fokussierung wurde ab dem Erreichen von 60.000 Vh gestoppt.

Spannungsverlauf der isoelektrischen Fokussierung

Schritt	Spannung [V]	Zeit [h]	Übergang
1	250	1	schnell
2	500	1	schnell
3	1.000	1	schnell
4	5.000	22	schnell
5	500	99	schnell

Nach der IEF wurden die Streifen für eine SDS-PAGE verwendet, oder in einer Kunststoffhülle bei -80 °C gelagert. Bei Weiterverwendung wurden die Streifen erst 15 min in SDS-Equilibrierungspuffer mit DTT und anschließend in SDS-Equilibrations Puffer mit Iodacetamid gewaschen. Es wurden 3-5 ml Waschlösung pro Streifen benötigt.

SDS-Equilibrierungspuffer

10 ml	1 M Tris, pH 8.8
72,07 g	Urea p.a.
60 ml	100 % Glycerol (v/v)
40 ml	10 % SDS (w/v)
400 μ l	1 % Bromphenolblau (w/v)
	mit MilliQ auf 200 ml auffüllen

Für SDS-Equilibrierungspuffer mit DTT wurden 150 µl einer 1 M DTT-Lösung zu 10 ml Puffer hinzugegeben. Für SDS-Equilibrierungspuffer mit Iodacetamid wurden 250 mg Iodacetamid zu 10 ml Puffer hinzugegeben.

Im nächsten Schritt wurden die Proteine in der zweiten Dimension nach Größe mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die SDS-Gel Gießvorrichtung wurde dafür gründlich mit Wasser und Baktolin® gesäubert und anschließend sehr gut mit deionisiertem Wasser gespült. Platzhalter und Glasplatten wurden in die Halterung eingelegt. Zwischen alle eingesetzten Teile wurde eine Plastikfolie gelegt. Die Halterung wurde verschlossen. Eine Schott-Flasche mit einem am unteren Glasausgang befestigten Schlauch wurde mit der Acrylamidgel-Lösung befüllt. Der Schlauch wurde an der Öffnung der Gießkammer befestigt. Die Gele befüllten sich von unten nach oben.

SDS-Gellösung für 4 Gele

232,0 ml	30 % Acrylamid
138,0 ml	1,5 M Tris-HCl pH 8.8
175,0 ml	MilliQ
5,5 ml	10 % SDS (w/v)
3,0 ml	10 % APS (w/v)
0,55 ml	TEMED

Nach etwa einer Stunde waren die Gele auspolymerisiert und konnten verwendet werden. Die Streifen der IEF wurden mit der Gelseite nach vorne luftblasenfrei auf dem SDS-Gel aufgelegt und mit Sealing Solution überschichtet.

Sealing Solution

1 %	Agarose (w/v)
1 Spatelspitze	Bromphenolblau in 1 x SDS-Laufpuffer

Die Gele wurden in die Gelkammer überführt und die Laufkammer mit 28 l SDS-Laufpuffer befüllt. Die Auftrennung erfolgte bei 1-2 W pro Gel (ca. 18 h) bis der Bromphenolblau-Streifen den unteren Rand des Gels erreicht. Die Gele wurden aus der Kammer entnommen und eine Stunde in Fixierlösung bei leichtem Schütteln fixiert.

Fixierlösung

40 %	Ethanol (v/v)
10 %	Essigsäure (v/v)
	in MilliQ

Anschließend wurden die Gele mit Krypton gefärbt. Dafür wurden die Gele zunächst 5 min mit dH₂O gewaschen und anschließend mit Krypton-Färbelösung schwenkend ü.N. bei RT gefärbt.

Krypton-Färbelösung

20 ml	10 x Krypton
180 ml	dH ₂ O

Im nächsten Schritt wurden die Gele einmal 15 min und einmal 30 min mit dH₂O gewaschen und mit einem Typhoon Fluoreszenzscanner eingescannt.

Scanner-Einstellungen

Emissionsfilter	LP 560 Ge. Purp.
Spannung	400 und 425 PMT
Laser	532 (grün)
	200 micron

Anschließend wurden die mit ausreichend Wasser befeuchteten Gele in Frischhaltefolie eingeschlagen und mit einem Schweißgerät eingeschweißt. So konnten sie bis zu vier Monate lang konserviert werden.

Die Analyse und Quantifizierung der Proteinspots wurde mit Delta 2D (Decodon) durchgeführt. Für die Identifizierung von Proteinspots wurden die Spots mit Hilfe eines Roboters ausgestanzt, mit Trypsin verdaut und mit Hilfe von Massenspektroskopie analysiert. Die Auswertung erfolgte durch Dr. Daniela Zühlke und Dr. Stephan Fuchs vom Institut für Mikrobiologie der Universität Greifswald.

4.9.10 Identifikation von Proteinen via Orbitrap

Die Sekretome für die Orbitrap Analysen wurden wie in Kapitel 4.9.3 beschrieben mit Hilfe von TCA gefällt. Die Proteinpellets wurden wegen der gleichzeitigen Durchführung einer 2 D-Gelelektrophorese in Rehydratisierungspuffer A resuspendiert. Auf eine SDS-PAGE wurden zwischen 25 und 35 µg Protein 1:4 verdünnt in 4 x SDS-Ladepuffer pro Spur aufgetragen. Nach dem Gellauf bei 45 mA pro Gel für ca. 45 min wurde die SDS-PAGE 1 h bei RT in Fixierlösung fixiert und ü.N. in Coomassie Silverblue gefärbt.

Fixierlösung

40 %	Ethanol abs. p.a.
10 %	Essigsäure p.a.
50 %	MilliQ

Die Gele wurden mit Wasser entfärbt und eingescannt. Jede Spur wurde mit einem Skalpell in zehn Teile zerschnitten. Jedes Teil sollte in etwa gleich viel Protein enthalten. Die einzelnen Gelstücke wurden in je ein Eppendorfgefäß überführt und mit MS-Wasser überschichtet. So konnten die Proben bis zur weiteren Verarbeitung bei 4 °C gelagert werden. Für den in-Gel-Verdau wurde das MS-Wasser abgenommen und 700 µl Gelwaschlösung hinzugegeben. Dieser Ansatz wurde bei 37 °C und 900 rpm geschüttelt, bis das Gelstück komplett entfärbt war.

Gelwaschlösung

0,7906 g	NH ₄ HCO ₃
15 ml	Acetonitril-ultrapure (30 %)
35 ml	MilliQ
	3-4 d haltbar

Als nächstes wurde das Gelstück in einer Speedvac bei 30 °C für 30 min getrocknet und 50 µl Trypsin hinzugegeben (1:10). Nach 20-minütiger Inkubation sollte die Lösung komplett vom Gel aufgenommen worden sein. Es wurde weiterhin Trypsin in 10-20 µl Schritten hinzugegeben, bis keine weitere Flüssigkeit vom Gel aufgenommen wurde.

Dann wurde der Überstand verworfen. Die Gelstücke wurden ü.N. bei 37 °C verdaut. Anschließend wurden 20 µl MS-Wasser hinzugegeben, bis das Gel komplett bedeckt war und die Proteine im Ultraschallbad 15 min eluiert. Die komplette Lösung wurde nun in der Speedvac bei 30 °C auf 3-10 µl eingeeengt und ein Gefäß überführt und die Proteine werden mit der Orbitrap vermessen. Die Auswertung erfolgte durch Florian Bonn und Dr. Stephan Fuchs vom Institut für Mikrobiologie der Universität Greifswald.

4.9.11 Identifikation von Proteinen via Synapt

Die Sekretome für die Synapt Analysen wurden mit Trichloressigsäure wie in Kapitel 4.9.3 beschrieben gefällt. Die Proteinpellets wurden wegen der gleichzeitigen Durchführung einer 2 D-Gelelektrophorese und einer Synapt-Messung in Rehydratisierungspuffer A resuspendiert. Da der Harnstoffpuffer die Synaptanalyse stören würde, wurden die Proteine mit einer Stage-Tip Aufreinigung umgepuffert. Im ersten Schritt wurden die Proteine ausgefällt. Dafür werden 100 µg Protein mit 50 mM TEAB um den Faktor 5 verdünnt. Als Standard wurden zu jedem Verdauansatz 1 µg BSA pipettiert. Zu 30 µl StrataClean Beats Suspension werden 200 µl 50 mM TEAB hinzugegeben und die Beats bei 10.000 rpm für 2 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Beats erneut mit 200 µl 50 mM TEAB gewaschen. Die verdünnte Proteinlösung wurde mit den Beads vermischt und ü.N. bei 4 °C im Rotationsschüttler inkubiert. Anschließend wurden die Beads bei 8.000 rpm für 3 min bei RT zentrifugiert und zweimal mit 200 µl 50 mM TEAB gewaschen. Dann wurden 1 µl 500 mM TCEP (1 mg in 7 µl TEAB) zugegeben und der Ansatz für 30-45 min bei 60 °C leicht schüttelnd inkubiert. Wenn der Ansatz auf RT abgekühlt war, wurden 2 µl 500 mM Iodacetamid (1 mg in 10,8 µl TEAB) zugegeben und für 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Für den tryptischen Verdau wurden 3 µl Trypsinlösung (1:10) zu jeder Proteinlösung hinzugegeben. Der Ansatz wurde 3 h bei 37 °C und 1100 rpm geschüttelt. Die Beats wurden bei 8.000 rpm für 3 min zentrifugiert und der Überstand für die Stage-Tip Aufreinigung verwendet. Die Spitzen wurden 5 mm unter der Fritte abgeschnitten und C18-Material in Methanol auf eine Höhe von 5 mm aufgeschichtet. Alle Wasch- und Beladeschritte erfolgten bei 10.000 rpm in einer Zentrifuge. Die Säule wurde anschließend dreimal mit je 100 µl Puffer A gewaschen.

Puffer A	
0,1 %	Essigsäure (v/v)
99,9 %	MS-Wasser

Dann wurde die Säule zweimal mit 100 µl Puffer B gewaschen.

Puffer B	
0,1 %	ACN
99,9 %	MS-Wasser

Die Säule wurde nun mit 100 µl Puffer A äquillibriert, wobei sie nicht trocken fallen sollte. Die Proteinlösung wurde auf die Säule gegeben und diese anschließend zweimal mit 100 µl Puffer A gewaschen. Ein Gefäß wurde ohne Deckel gewogen und die Proteinlösung mit 30 µl 100 % Puffer B in das Vial eluiert. Zum Eluat wurden 20 µl MS-Wasser hinzugefügt und die Probe auf 10 µl in der Speedvac eingedampft. Das Vial wurde erneut ausgewogen und auf 10 µl aufgefüllt. Als Standard wurden 50 fmol/ 100 µl ADH hinzugegeben. Zuletzt wurden 10 µl MS-Wasser dazu pipettiert und 10 µl der Lösung in der Synapt vermessen. Der Rest der Lösung wurde bei -70 °C aufbewahrt. Die Auswertung erfolgte durch Dr. Daniela Zühlke und Dr. Stephan Fuchs vom Institut für Mikrobiologie der Universität Greifswald.

5 Ergebnisse

5.1 Sekretionsstudien zum *L. pneumophila* Mip-Protein

Trotz einer ausführlichen Charakterisierung des Mip-Proteins in der Vergangenheit, blieb ungeklärt, wie das Mip-Protein sezerniert wird. In diesem Kapitel wird der Sekretionsweg des Proteins aufgeklärt.

5.1.1 Mip wird über das Typ-II-Sekretionssystem sezerniert

Das Mip-Protein von *L. pneumophila* ist mit der äußeren Membran assoziiert und besitzt keine Transmembrandomäne (Riboldi-Tunnicliffe *et al.*, 2001). Um herauszufinden, wie es sezerniert wird, wurden Mutanten mit Defekt in je einem Sekretionssystem verwendet. Die *tolC*-Mutante und die *lssB*-Mutante haben keine T1SS-Sekretion mehr, *lssB*(+) ist die Komplementante der *lssB*-negativen Mutante. Die *TatC*-Mutante hat einen Defekt in der Translokation über die innere Membran via das Tat-System, was den initialen Schritt der Typ-II-Sekretion darstellt. Das T2SS selber ist bei *ΔlspDE* ausgeschaltet. In dieser Versuchsreihe wurde eine *lspDE*-Deletionsmutanten verwendet. Bei dieser Mutante können aufgrund einer genetischen Manipulation die Proteine LspD und LspE nicht mehr gebildet werden. Dies hat einen nicht mehr funktionalen Aufbau des T2SS zur Folge. Die Mutante wurde von Klaus Heuner aus Berlin zur Verfügung gestellt. Als T4SS-Mutante wurde *dotA*⁻ verwendet.

Für die Durchführung wurde etwas Kultur von T1SS-, T2SS- und T4SS-Mutanten mit Ladepuffer aufgekocht und die Lysate auf eine SDS-PAGE aufgetragen. Die Proteine wurden anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet und das Mip-Protein unter Einsatz eines anti-Mip Antikörpers angefärbt. Als Kontrolle diente die Mip-negative Mutante.

In Abbildung 22 ist zu erkennen, dass bei fast allen Ansätzen das Mip-Protein nachgewiesen wurde. In der Spur der Mip-negativen Mutante, die als Negativkontrolle galt, war keine Bande zu sehen. Die Spuren der *lspDE*-Mutanten zeigten je eine leichte Bande. Dies lässt die Vermutung zu, dass Mip über das T2SS sezerniert wird. Die

leichte Bande kann eine Kontamination durch zytoplasmatisches Mip darstellen, was durch die Lyse der Zellen beim Aufkochen der Proteinprobe mit Ladepuffer freigesetzt worden sein kann. Des Weiteren ist zu erkennen, dass trotz einer Deletion im Tat-System das Mip-Protein nachweisbar war. Dies kann auf eine Translokation durch das Sec-System hinweisen.

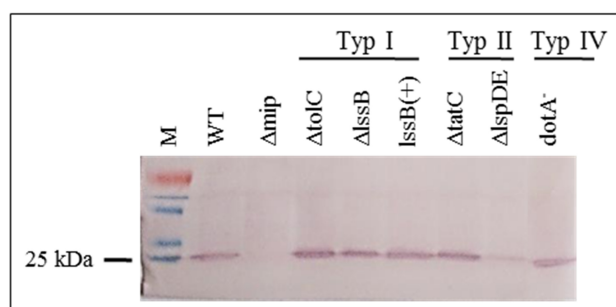


Abbildung 22: Western Blot der Lysate verschiedener Sekretionssystemmutanten. Etwas Kultur von T1SS-, T2SS- und T4SS-Mutanten mit Ladepuffer aufgekocht. Bei $\Delta tolC$ und $\Delta lssB$ handelt es sich um T1SS-Mutanten, $lssB(+)$ ist die Komplementante der $lssB$ -negativen Mutante. Die Mutante $\Delta tatC$ hat einen Defekt in der Translokation über die innere Membran via Tat-System, was den initialen Schritt der Typ-II-Sekretion darstellt. Das T2SS selber ist bei der Mutante $\Delta lspDE$ ausgeschaltet und das T4SS bei $dotA$. Die Proteine der Lysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Proteine wurden zunächst mit dem anti-Mip Antikörper (2D8), dann mit einem Ziege-anti Maus AP Antikörper inkubiert und mit BCIP und NBT in AP-Puffer entwickelt. Bei fast allen Ansätzen konnte das Mip-Protein nachgewiesen werden. In der Spur der Mip-negativen Mutante war keine Bande und in den Spuren der $lspDE$ -Mutanten nur eine leichte Bande zu sehen.

Um das Ergebnis zu präzisieren, wurde die Durchführung dieses Versuchs optimiert. In diesem Ansatz wurden die Proteine der äußeren Membranen der T1SS-, T2SS- und T4SS-Mutanten mit je vier verschiedenen Methoden abgetrennt. Der Grund hierfür ist, dass jedes der Proteine sich mit einer anderen Methode besser isolieren lässt. Für Mip ist bisher nicht bekannt, welche Methode die Geeignetste ist. Das Shaven erfolgte mit Hilfe von Na_2CO_3 , Harnstoff, Triton X-100 oder Natriumazetat ($NaOAc$). Die isolierten Proteine wurden im Anschluss mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Der Nachweis des Mip-Proteins erfolgte wie bereits beschrieben. Bei der Isolation äußerer Membranproteine mit Hilfe von Na_2CO_3 wurde in allen Spuren das Mip-Protein angefärbt.

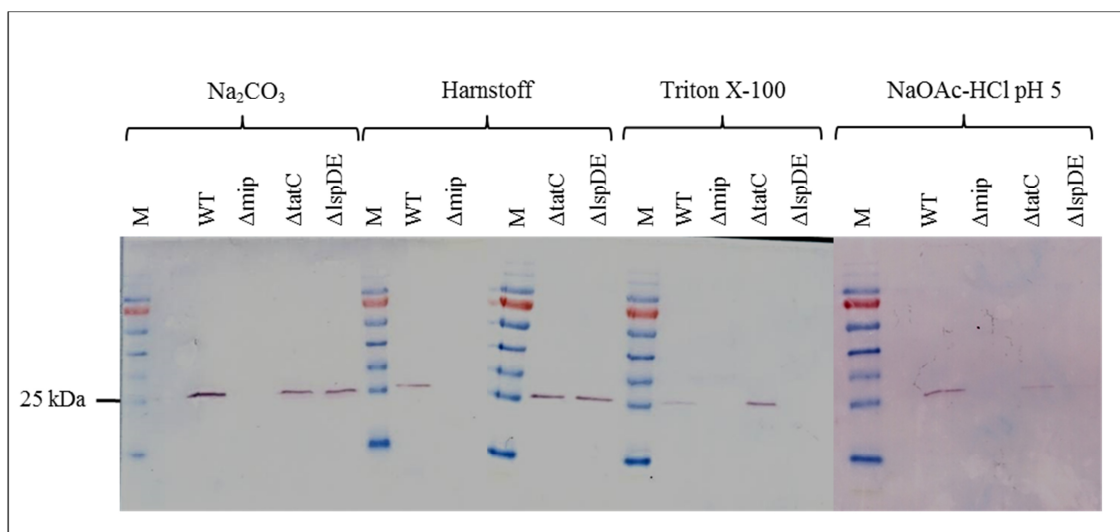


Abbildung 23: Western Blot der äußeren Membranproteine verschiedener Sekretionssystem-mutanten. Die äußeren Membranproteine von T1SS-, T2SS- und T4SS-Mutanten wurden mit Hilfe von Na_2CO_3 , Harnstoff, Triton X-100 oder Natriumazetat isoliert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Proteine wurden zunächst mit einem anti-Mip Antikörper (2D8), dann mit einem Ziege-anti Maus AP Antikörper inkubiert und mit BCIP und NBT in AP-Puffer entwickelt. Nach der Behandlung mit Na_2CO_3 wurde in allen Spuren das Mip-Protein angefärbt. Die Bande der Negativkontrolle Δmip blieb leer. Bei den Proteinisolationen durch Harnstoff und NaOAc gab es widersprüchliche Ergebnisse. Hier war bei jeweils einer der beiden T2SS-Mutanten Mip nachweisbar. Bei dem Ansatz mit Triton X-100 war Mip unter den Proteinen der äußeren Membran der T2SS-Mutanten nicht vertreten. Bei allen vier Methoden war Mip beim deletierten Tat-System nachweisbar.

Nur die Bande der Negativkontrolle Δmip blieb leer. Dies lässt eine vollständige Lyse der Zelle vermuten. Bei den Proteinisolationen durch Harnstoff und NaOAc gab es widersprüchliche Ergebnisse. Hier war interessanter Weise bei jeweils einer der beiden T2SS-Mutanten Mip nachweisbar. Bei dem Ansatz mit Triton X-100 ist Mip unter den Proteinen der äußeren Membran der T2SS-Mutanten nicht vertreten. Beim Wildtyp und der Tat-negativen Mutante konnte Mip von der äußeren Membran isoliert werden. Das Shaving mit Triton X-100 ist also die einzige geeignete Methode. Mit Hilfe des zusätzlich durchgeführten Versuchs konnte bestätigt werden, dass das Mip-Protein über das T2SS sezerniert und vermutlich über das Sec-System transloziert wird.

5.2 Ko-Lokalisationsstudien von LCVs mit Lysosomen in *D. discoideum*

Um die Rolle von Mip beim intrazellulären Trafficking näher zu charakterisieren, sollte in diesem Teil der Arbeit der Einfluss von Mip auf die Ko-Lokalisation von Phagosom und Lysosom nach der Infektion von *D. discoideum* mit *L. pneumophila* zu untersuchen.

5.2.1 Mip spielt eine Rolle bei der Verhinderung der phagolysosomalen Fusion in *D. discoideum*

Das Mip-Protein ist ein wichtiger Faktor für die intrazelluläre Replikation in Makrophagen und Amöben (Cianciotto *et al.*, 1990; Cianciotto und Fields, 1992). Um zu definieren, ob Mip eine Rolle bei der phagolysosomalen Fusion spielt oder für die Replikation selber wichtig ist, wurden Ko-Lokalisationsexperimente mit LCVs verschiedener Mutanten und Lysosomen durchgeführt. Dafür wurden Zellen von *D. discoideum* mit Rhodamin-markierten Mip-defizienten Legionellen infiziert. Als Kontrollen dienten der Wildtyp und die DotA-negative Mutante. Nach 4 und 17 h wurden die Zellen mit Methanol fixiert und die Lysosomen mit einem anti-Mannose-6-Sulfat (M-6-S) Antikörper angefärbt. Die Proben wurden mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop (CLSM) fotografiert und die Ko-Lokalisation mit Hilfe von ImageJ quantifiziert. In Abbildung 24 A sind repräsentative konfokal-mikroskopische Bilder der frühen Phase der Infektion (4 h) dargestellt. Abbildung 24 B zeigt die quantitative Auswertung ausgehend von 100 ausgewerteten Phagosomen aus je drei biologischen Replikaten pro Stamm. In beiden Darstellungen ist zu erkennen, dass die Phagosomen der in der Replikation beeinträchtigten DotA-Mutante signifikant öfter (1,7-fach) mit den M-6-S-markierten Lysosomen ko-lokalisierten als der WT und die Mip-negativen Mutante. Bei der DotA-negativen Mutante wurde also nach 4 h die intrazelluläre Degradation durch die Verschmelzung von Phagosom und Lysosom in die Wege geleitet, bei den anderen Stämmen dagegen nicht. Nach 17 h, stieg die Anzahl der mit Lysosomen ko-lokalisierten LCVs bei der Mip-negativen Mutante jedoch stark an (Abb. 24 C). Im Vergleich zum Wildtyp wurde eine um 50 % höhere Verschmelzungsrate von Phagosom und Lysosom beobachtet.

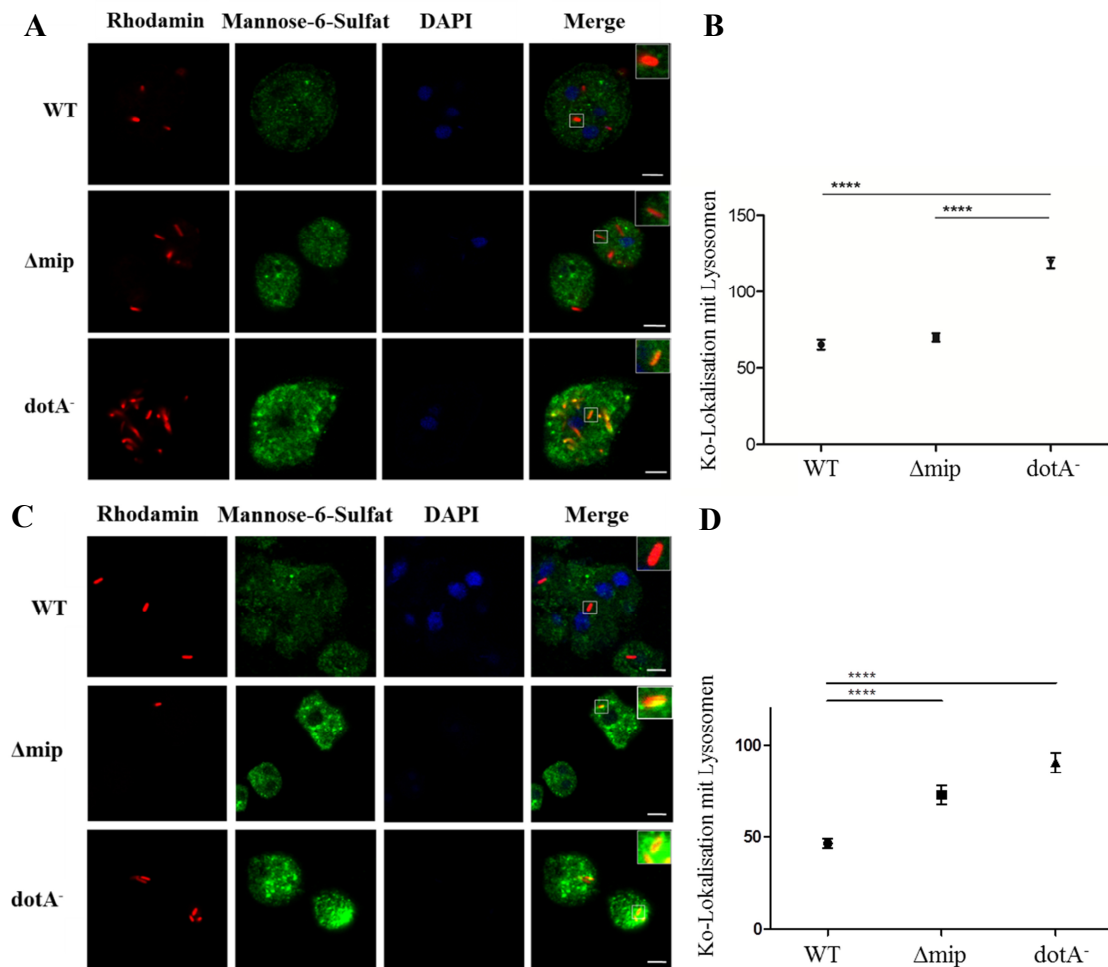


Abbildung 24: Ko-Lokalisation von LCVs verschiedener Mutanten mit Lysosomen während der Infektion in *D. discoideum*. Zellen des Modellorganismus *D. discoideum* wurden je mit Rhodamin-markierten (rot) *L. pneumophila* Corby WT, Δmip und einer DotA-negativen Mutante infiziert (MOI 100). Nach 4 h (A und B) und 17 h (C und D) wurden die Zellen mit Methanol fixiert und die Lysosomen mit einem anti-Mannose-6-Sulfat (M-6-S) Antikörper angefärbt (grün). (A und C) Repräsentative konfokal-mikroskopische Bilder zeigen nach 4 h (A) und 17 h (C), dass die Phagosomen der DotA-Mutante öfter mit den M-6-S-markierten Lysosomen ko-lokalisierten als der WT und die Mip-negative Mutante. Nach 17 h (C) ko-lokalisierten auch die Δmip enthaltenen LCVs vermehrt mit dem Lysosom. (B und D) Ausgehend von 100 ausgewerteten Phagosomen aus je drei biologischen Replikaten pro Stamm, wurde die Ko-Lokalisation zwischen Phagosom und M-6-S-markierten Lysosomen quantifiziert. Die statistische Relevanz wurde mit Hilfe des Student's *t*-test ermittelt (****, $p \leq 0,00001$). Bei der Einheit handelt es sich um beliebige Fluoreszenz-Einheiten. Bei der DotA-negativen Mutante wurde nach 4 h (B) die intrazelluläre Degradation durch die Verschmelzung von Phagosom und Lysosom in die Wege geleitet. Dagegen ko-lokalisierten die Phagosomen des Wildtyps und der Mip-negativen Mutante innerhalb dieses Zeitraums kaum mit den M-6-S-markierten Lysosomen. Bei dem WT wurden nach 17 h (D) kaum Bakterien durch die Verschmelzung von Phagosom und Lysosom degradiert. Dagegen ko-lokalisierten die Phagosomen der DotA- und Mip-Mutante stark vermehrt mit den M-6-S-markierten Lysosomen, was eine gesteigerte Degradation zur Folge hatte.

Der daraus resultierende vermehrte Abbau der Mip-Mutante war signifikant. Auch die DotA-negative Mutante wurde vermehrt abgebaut. Beide Mutanten zeigen nach 17 h in etwa das gleiche Ko-Lokalisationslevel.

Das Mip-Protein spielt also eine Rolle bei der Verhinderung der phagolysosomalen Fusion nach 17 h in *D. discoideum* oder bei der Aufrechterhaltung der LCV während der Infektion.

5.3 Infektionen von HLTEs mit einer Mip-negativen Mutante

Um das Mip-Protein als Virulenzfaktor näher zu charakterisieren, sollte in diesem Teil der Arbeit die Rolle von Mip bei der Infektion von humanem, explantiertem Lungengewebe aufgeklärt werden.

5.3.1 Mip-defiziente Legionellen lokalisieren vermehrt in Makrophagen

Das Mip-Protein ist in der Lage an Collagen IV zu binden, was ein großer Bestandteil des Bindegewebes der menschlichen Lunge ist (Wagner *et al.*, 2007). Um herauszufinden, wo eine Mip-negative Mutante ohne Collagen-bindendes Protein an der Oberfläche in Lungengewebe lokalisiert ist, wurden HLTEs infiziert. Nach 24 h wurde das Gewebe fixiert, dehydriert, in Paraffinblöcke gegossen und die Schnitte mit einem anti-*Legionella* Antikörper angefärbt. Als Kontrolle dienten in Medium inkubiertes und mit dem Wildtyp infiziertes Gewebe. Der Wildtyp lokalisiert, wie bereits beschrieben, in den alveolaren Makrophagen, aber auch vermehrt an den Lungen-Epithelzellen und der alveolaren Auskleidung. Die *mip*-Deletionsmutante ist dagegen vor allem in alveolaren Makrophagen lokalisiert, aber auch in Epithelzellen zu finden (Abb. 25). An der alveolaren Auskleidung waren im Vergleich zum Wildtyp weitaus weniger Bakterien nachzuweisen. Weiterhin war auffällig, dass bei der Infektion mit der Mip-negativen Mutante insgesamt mehr Makrophagen im Gewebe nachzuweisen waren. Zusammenfassend wurde gezeigt, dass Mip wichtig für die Bindung an die alveolare Auskleidung wichtig ist.

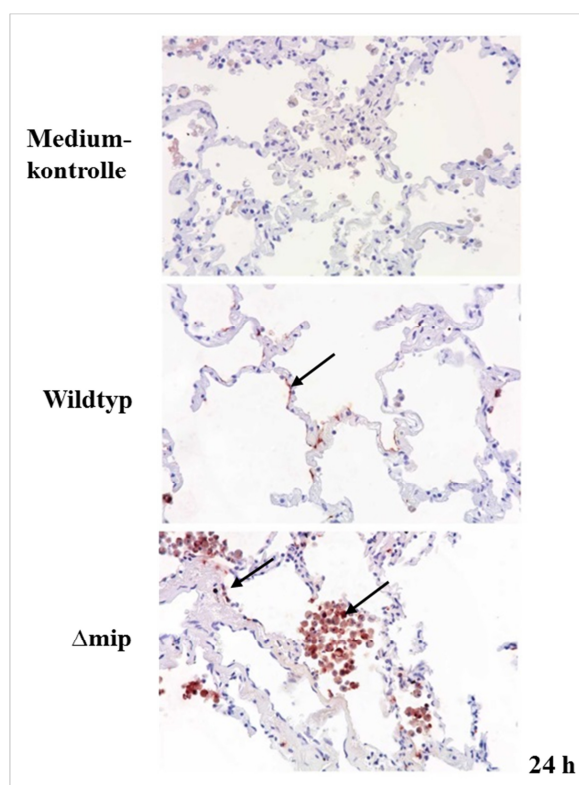


Abbildung 25: Lokalisation von Legionellen in infizierten HLTEs nach 24 h. HLTEs wurden mit dem LpC Wildtyp und der *mip*-Deletionsmutante infiziert. Nach 24 h wurde das Gewebe fixiert, dehydriert und in Paraffinblöcke gegossen. Das Gewebe wurde mit Hämatoxylin und Eosin und die Legionellen mit einem anti-*Legionella* Antikörper gefärbt. Die Mip-negative Mutante war im Vergleich zum Wildtyp weniger häufig an der alveolaren Auskleidung lokalisiert.

5.3.2 Infektion mit *mip*-Deletionsmutante hat verringerten Gewebeschaden zur Folge

Bei der Infektion von humanem Lungengewebe schädigt *L. pneumophila* die Gewebestruktur nachhaltig. Es kommt vor allem zu Exudatansammlungen im alveolaren Lumen, zur Delaminierung der alveolaren Epithelzellen und zur Desintegration des Bindegewebes (Jäger, Marwitz, *et al.*, 2014). Um herauszufinden ob das Mip- Protein bei der Ausbildung des Gewebeschadens eine Rolle spielt, wurden HLTEs je mit der Mip-negativen Mutante und rekombinantem Mip-Protein inkubiert. Als Vergleich dienten eine Wildtyp-Infektion und uninfiziertes Gewebe. Nach 2, 24 und 48 h wurden die infizierten HLTEs mit der HOPE-Technik fixiert, dehydratisiert und in

Paraffinblöcke gegossen. Die Gewebeschnitte wurden mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Für die Bestimmung des Damage Scores wurden Schnitte von sechs verschiedenen Patienten begutachtet. In Abbildung 26 A sind repräsentative Gewebeschnitte der Mediumkontrolle, der Wildtyp und Mip-Mutanten Infektion und der Inkubation mit rekombinantem Mip-Protein nach 2, 24 und 48 h dargestellt. Abbildung 26 B zeigt den quantifizierten Gewebeschaden der jeweiligen Infektion. Das Gewebe der Mediumkontrolle wurde nach zweistündiger Infektion bei einem Damage Score von 1 eingeordnet. Nach 24 Stunden verschlechterte sich die alveolare Integrität etwas, es kam vereinzelt zu Exudatansammlungen im alveolaren Lumen und zu Epithelablösungen. Deshalb wurde das Gewebe zu diesem Zeitpunkt auf einem Damage Score von 2 eingestuft. Nach 48 h verschlechterte sich die Gewebestruktur weiterhin auf einen Damage Score von 3. Nach der Wildtyp-Infektion zeigte das Gewebe schon nach zwei Stunden einen vermehrten Schaden mit einem Damage Score von 3. Nach 24 h überschritt die Schädigung einen Wert von 4 und nach 48 h lag der Damage Score bei 6. Der von der Mip-negativen Mutante ausgelöste Gewebeschaden war mit dem des uninfizierten Gewebes vergleichbar. Nach zwei Stunden bestand die beobachtete Schädigung ausschließlich aus Exudatansammlungen im alveolaren Lumen und wurde als Stufe 1 eingeordnet. Nach 24 h kamen auch alveolare Desintegrität und Epithelablösungen vereinzelt vor, weshalb der Score bei einem Wert von 2 lag. Nach 48 h nahm der Schaden weiter zu und erreichte den Wert 3. Das Fehlen des Mip-Proteins führt also insgesamt zu einer Verringerung des durch die Infektion hervorgerufenen Gewebeschadens. Diese Verringerung war im Vergleich zum vom Wildtyp verursachten Schaden nach 24 h signifikant. Nach 48 h dagegen ist trotz des großen Unterschiedes von 3 Stufen keine Signifikanz vorhanden, da die Standardabweichung zu hoch und die Anzahl der Stichproben zu niedrig war. Um zu analysieren, ob im Gegenzug das rekombinant aufgereinigte Mip-Protein mit bestehender PPIase-Aktivität in der Lage ist, das Lungengewebe zu schädigen, wurden HLTEs mit dem Protein inkubiert. Interessanterweise war bei diesem Versuchsansatz ein verringerter Gewebeschaden festzustellen. Nach zwei Stunden waren nur vereinzelt eine geringe Schädigung zu beobachten (Damage Score 0), nach 24 h lag der Wert bei 1 und nach 48 h bei 2. Damit befand sich der Schädigungsgrad sogar leicht unter dem Niveau der Mediumkontrolle. Auch hier ist der Unterschied nach 24 h signifikant, nach 48 h trotz einer Differenz von 4 Stufen jedoch nicht.

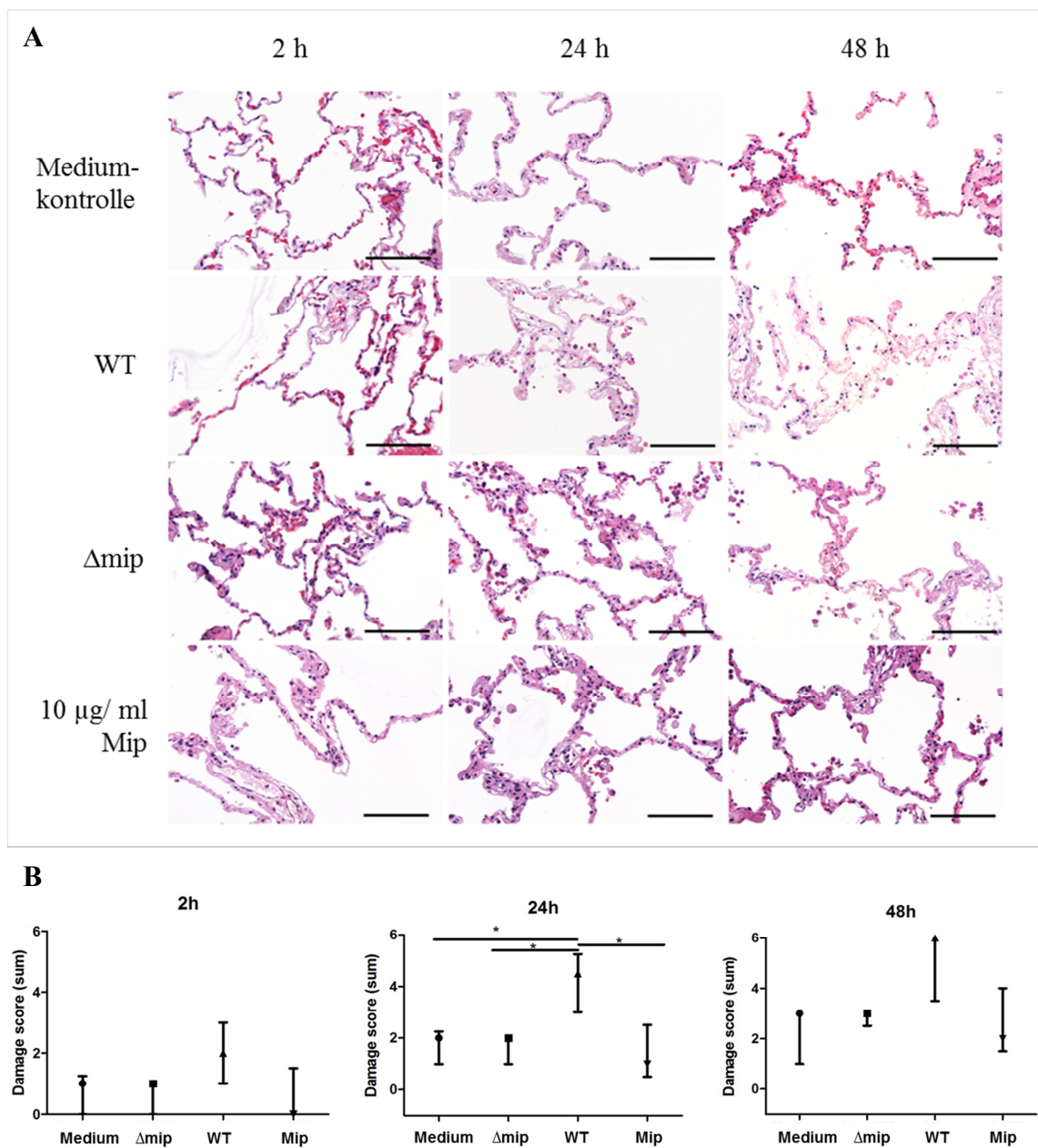


Abbildung 26: Schädigung von mit Legionellen infizierten HLTEs ist bedingt Mip-abhängig. (A) Hämatoxilin-Eosin gefärbte HLTE-Schnitte nach 2, 24 und 48 h der Mediumkontrolle und Inkubationen mit LpC Wildtyp, Δmip und 10 $\mu g/ml$ rekombinantem Mip-Protein. (B) Für jeden Zeitpunkt und jede Bedingung der Infektion wurde der histologische Gewebeschaden klassifiziert. Bewertet wurden die Kategorien Protein-Exudat, Delaminierung der Epithelzellen und Integrität der alveolaren Septen auf einer Skala von 0-3. Aus den Damage Scores aller sechs Patienten wurden der Median und der Interquartilsabstand bestimmt. Anschließend wurden für die Bestimmung der Signifikanz der Kruskal-Wallis Test mit Dunns Mehrfachvergleich angewendet (* $p \leq 0,05$). Das mit der Mip-negativen Mutante infizierte Lungengewebe war weniger geschädigt als das mit dem Wildtyp infizierte. Das Mip-Protein konnte alleine keinen Gewebeschaden hervorrufen.

Zusammenfassend wurde beobachtet, dass mit der Mip-negativen Mutante infiziertes Lungengewebe in einem weitaus geringeren Maß geschädigt wird als mit dem Wildtyp infiziertes. Die Schädigung befand sich sogar auf dem Level der uninfizierten Kontrolle. Das Mip-Protein alleine, war jedoch nicht in der Lage einen Gewebeschaden hervorzurufen. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass das Mip-Protein zusammen mit weiteren Faktoren an der Zersetzung des Lungengewebes beteiligt ist.

5.3.2.1 Mip beeinflusst die intrazelluläre Replikation in HLTEs

Zusätzlich zu den histopathologischen Studien sollte auch die Vermehrung der *mip*-Deletionsmutante im Lungengewebe untersucht werden. Dafür wurden die HLTEs in kleine Stückchen geschnitten und in *Legionella*-haltiges RPMI überführt. Neben der *mip*-Deletionsmutante wurden der Wildtyp und der replikationsgeschwächte Stamm *dotA*⁻ als Kontrollstämme verwendet.

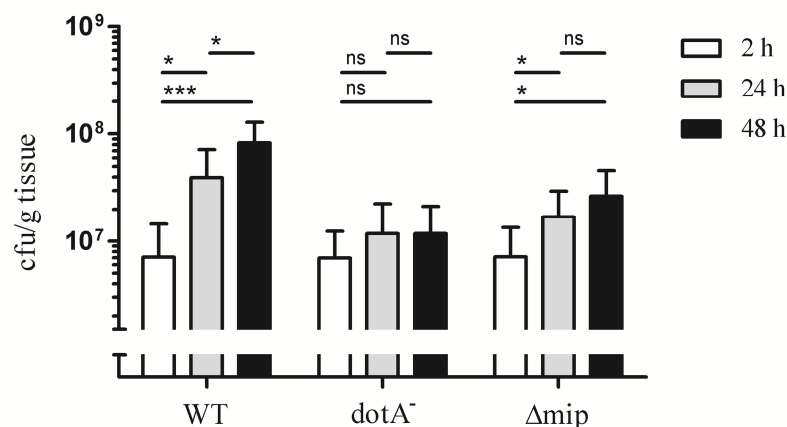


Abbildung 27: Infektion von HLTEs mit Legionellen. HLTEs wurden mit dem LpC Wildtyp, *dotA*⁻, und Δmip infiziert (n=6). Die Ansätze wurden nach 2 h, 24 h und 48 h homogenisiert, ausplattiert und die cfu-Werte bestimmt. Die Signifikanz wurde mit einem einseitigen *t*-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 % errechnet (**p* ≤ 0,05; ***p* ≤ 0,01; ****p* ≤ 0,001). Die *mip*-Deletionsmutante zeigte eine verringerte intrazelluläre Replikation.

Nach 2, 24 und 48 h wurde das HLTE-Stück gewogen, homogenisiert und die Anzahl der intrazellulären Bakterien durch Ausplattieren auf BCYE-Agar bestimmt. In Abbildung 27 ist die intrazelluläre Replikation der verschiedenen Stämme dargestellt. Der Wildtyp vermehrte sich über die Zeitpunkte konstant. Nach zwei Stunden wurde eine Zellzahl von 7×10^6 cfu/ g Gewebe beobachtet, nach 24 h stieg diese auf 3×10^7 cfu/ g Gewebe und nach 48 h auf 8×10^7 cfu/ g Gewebe. Die Vermehrung wurde als signifikant verifiziert. Der Stamm *dotA*⁻ lag nach 2 h auch bei ca. 7×10^6 cfu/ g Gewebe, vermehrte sich nach 24 h leicht auf $1,25 \times 10^6$ cfu/ g Gewebe und stagnierte nach 48 h. Die Vermehrung der DotA-Mutante ist zu keinen Zeitpunkt signifikant. Die *mip*-Deletionsmutante vermehrt sich zwischen 2 h und 24 h signifikant 2,5-fach auf ca. $1,75 \times 10^7$ cfu / g Gewebe. Von 24 h auf 48 h multiplizierte sie sich geringfügig auf eine cfu von $2,75 \times 10^7$ pro g Gewebe. Die Vermehrung zwischen 2 h und 48 h war ebenfalls signifikant (* $p \leq 0,05$). Die Vermehrung zwischen 24 h und 48 h wurde jedoch als nicht signifikant errechnet. Nach 24 h wurde bei der Mip-Mutante ein 1,7-fach geringerer cfu-Wert und nach 48 h ein 2,9-fach geringerer cfu-Wert als beim Wildtyp ermittelt. Zusammenfassend wurde gezeigt, dass die *mip*-Deletionsmutante sich schlechter als der Wildtyp in humanem Lungengewebe vermehren kann.

5.4 Analyse des Mip-abhängigen Sekretoms

Da Mip bei der Infektion von humanem Lungengewebe mit *L. pneumophila* eine indirekte Rolle spielt und in der Lage zu sein scheint, andere Proteine zu beeinflussen, sollte in diesem Teil der Arbeit der mögliche Einfluss von Mip auf das Sekretom der Legionellen charakterisiert werden. Außerdem sollten ausgewählte Mip-abhängig sezernierte Kandidaten näher analysiert werden.

5.4.1 *Legionella*-Sekretome können die effiziente Replikation der *mip*-Deletionsmutante in Makrophagen komplementieren

Unter der Annahme, dass Mip zur Gewebeerstörung durch die Beeinflussung anderer Virulenzfaktoren indirekt beiträgt, wurden Replikations-Komplementationsversuche mit Sekretomen durchgeführt. Als Wirtssystem für diese Versuchsreihe wurden

Makrophagen verwendet, weil sie die Zellen der menschlichen Lunge sind, in denen sich Legionellen hauptsächlich vermehren (Jäger, Marwitz, *et al.*, 2014). Für die Durchführung wurden THP-1-Zellen mit dem Wildtyp und der *mip*-Deletionsmutante infiziert und je das native Sekretom einer Wildtyp-Kultur ($OD_{600}=3$) und einer Δmip -Kultur ($OD_{600}=3$) zugegeben. Alle Ansätze wurden nach 24 h und 48 h ausplattiert und die cfu pro ml bestimmt (Abb. 28). Nach 24 h hatte der Wildtyp einen cfu-Wert von ca. 2×10^6 /ml erreicht. Durch die Zugabe des Wildtyp- und Δmip -Sekretoms konnte keine signifikante Steigerung der Bakterienzahl hervorgerufen werden. Die Mip-negative Mutante erreichte dagegen nur eine cfu von 5×10^4 /ml. Auch in diesem Fall hatte das Zufügen der Sekretome keine signifikante Steigerung der intrazellulären Bakterienzahl zur Folge. Nach 48 h erhöhte sich der cfu-Wert des Wildtyps um das 14-fache auf 3×10^7 /ml. Die Ansätze mit zugefügtem Sekretom wiesen einen cfu-Wert von ca. 2×10^7 /ml auf, unterschieden sich also nicht signifikant von der Infektion ohne Sekretomzugabe.

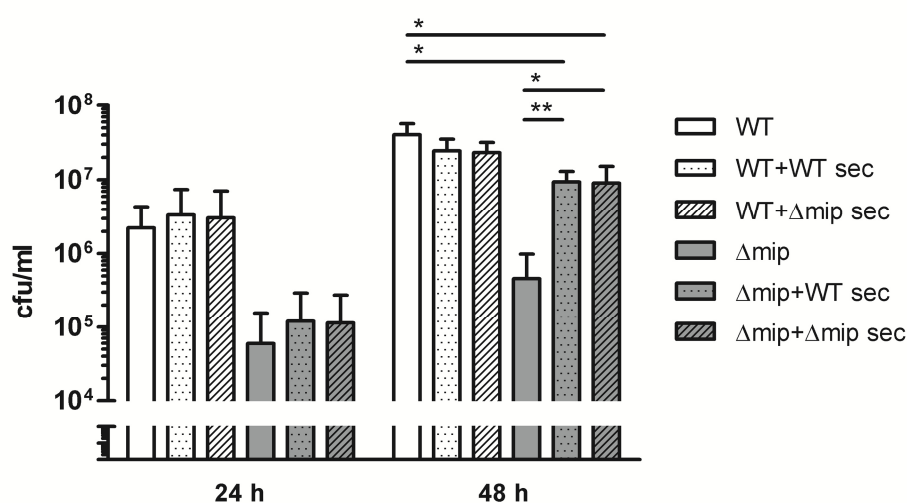


Abbildung 28: Infektion von THP-1 Makrophagen mit Legionellen unter Zugabe von *Legionella*-Sekretomen. THP-1 Makrophagen wurden mit dem LpC Wildtyp und der *mip*-Deletionsmutante infiziert. Zusätzlich wurden zu jedem Stamm je 40 μ g/ml Sekretom des Wildtyps oder 40 μ g/ml Sekretom der *mip*-Deletionsmutante hinzugefügt. Die Ansätze wurden nach 24 h und 48 h ausplattiert und die cfu-Werte bestimmt. Die Signifikanz wurde mit einem einseitigen *t*-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 % errechnet (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$). Der Replikationsnachteil der *mip*-Deletionsmutante konnte durch die Zugabe beider Sekretome komplementiert werden.

Die Mip-negative Mutante vermehrte sich ohne Sekretom-Zusatz auf einen cfu-Wert von 3×10^5 / ml. Sowohl mit Wildtyp- als auch mit Δmip -Sekretom wurde die Vermehrung um das 32-fache gesteigert. Durch den Zusatz der Sekretome erreichte die *mip*-Deletionsmutante einen cfu-Wert von je 1×10^7 pro ml, was der Replikationsrate des Wildtyps nahe kam. Dies stellte einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Mip-Mutante ohne Sekretom-Zugabe dar.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der Replikationsnachteil der *mip*-Deletionsmutante durch die Zugabe beider Sekretome komplementiert werden kann.

5.4.2 Die *mip*-Deletionsmutante sezerniert mehr Proteine als der Wildtyp

Da *Legionella*-Sekretome die effiziente Replikation der *mip*-Deletionsmutante in Makrophagen wiederherstellen können, sollten im nächsten Schritt die Sekretome des Wildtyps und der *mip*-Deletionsmutante verglichen werden. Dafür wurden Wachstumsversuche in YEB durchgeführt und nach mehreren Zeitpunkten die OD₆₀₀ und die Proteinkonzentration im zellfreien Kulturüberstand bestimmt.

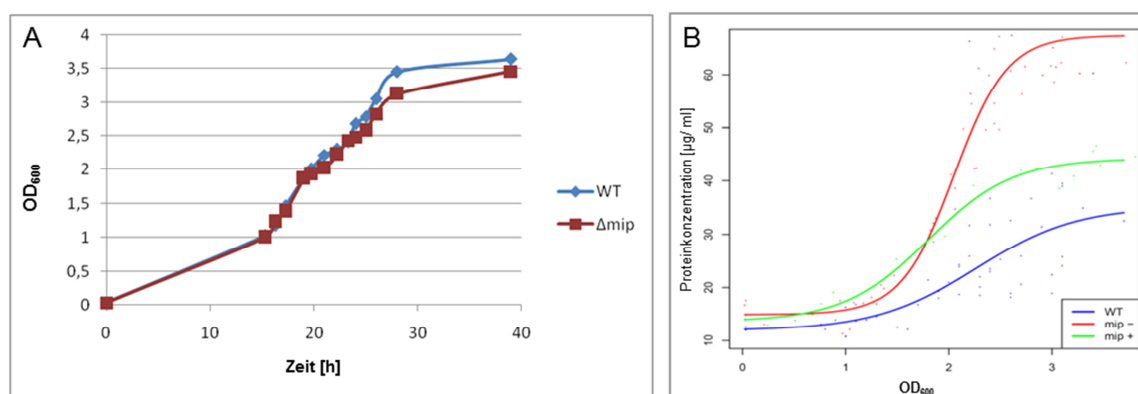


Abbildung 29: Wachstumsversuche mit Bestimmung der Proteinkonzentration im zellfreien Kulturüberstand. (A) *L. pneumophila* WT und Δmip wurden in YEB-Medium kultiviert und die OD₆₀₀ zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen. Die *mip*-Deletionsmutante hat keinen Wachstumsnachteil. (B) *L. pneumophila* WT, Δmip und Mip (+) wurden in YEB-Medium kultiviert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die OD₆₀₀ bestimmt und aus dem zellfreien Kulturüberstand die Proteinkonzentration mit Hilfe von Roti-Nanoquant ermittelt. Im Überstand der *mip*-Deletionsmutante lagen die Proteine akkumuliert vor.

In Abbildung 29 A sind die optische Dichte des Wildtyps (blau) und der Mip-Mutante (rot) im Verhältnis zur Wachstumsdauer dargestellt. Beide Stämme gingen nach einer Verzögerungsphase von ca. 8 h in die exponentielle Wachstumsphase über. Nach Erreichen der OD₆₀₀ von 2,8 war die frühe stationäre Wachstumsphase erreicht. Die *mip*-Deletionsmutante zeigte im Vergleich zum Wildtyp keinen Wachstumsnachteil. Die Analyse des zellfreien Kulturüberstandes des Wildtyps (blau), der *mip*-Deletionsmutante (rot) und der Mip-Komplementante ist in Abbildung 29 B dargestellt. Ab einer OD₆₀₀ von 1 steigt die Konzentration der extrazellulären Proteine an. Die Kurve der Proteinsekretion des Wildtyps hat die geringste Steigung. Bei einer OD₆₀₀ von ca. 2,8 ging nicht nur das Wachstum, sondern auch die Proteinsekretion mit einem durchschnittlichen Wert von 30 µg/ml in die stationäre Phase über. Auch das Sekretom der Mip-Komplementante vermehrte sich ab einer OD₆₀₀ von 1 und stagniert bei einer OD₆₀₀ von ca. 2,8. Jedoch liegt die Proteinkonzentration während der stationären Sekretion bei 40 µg/ml. Die meisten Proteine werden von der *mip*-Deletionsmutante sezerniert. Diese Kurve ist sigmoidal und hat die größte Steigung. Die OD₆₀₀ für den Eintritt in die stationäre Sekretion lag wie bei den anderen Stämmen bei einem Wert von ca. 2,8, im zellfreien Kulturüberstand wurde in dieser Phase aber eine Proteinkonzentration von 65 µg/ml gemessen. Beim Vergleich der Sekretionsmenge des Wildtyps und der Mip-Mutante fiel auf, dass die Mutante ab einer OD₆₀₀ von 1,2 mehr Proteine sezernierte. In der stationären Sekretionsphase erreicht die *Δmip* eine 2-fach höhere Proteinkonzentration. Die Komplementante befindet sich auf dem Niveau zwischen Wildtyp und der Mip-Mutante.

Um herauszufinden, wie sich die unterschiedliche Proteinmenge im Sekretom der *mip*-Deletionsmutante auf das Proteinprofil auswirkt, wurden die Sekretome mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Dafür wurden Vorkulturen beider Stämme bei einer OD₆₀₀ von 3 geerntet und die Proteinkonzentration des zellfreien Kulturüberstandes gemessen. Von dem mit Trichloressigsäure gefällten Sekretom des Wildtyps wurden 20 µg auf das Gel aufgetragen, von dem Sekretom der *mip*-Deletionsmutante 26,8 µg. Dies entsprach einem Verhältnis von 1:1,34, welches die unterschiedliche Proteinkonzentration des Sekretoms der beiden Kulturen zum Zeitpunkt der Ernte darstellte.

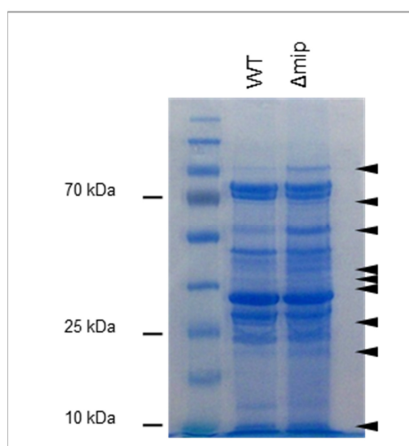


Abbildung 30: SDS-PAGE der Sekretome des Wildtyps und der *mip*-Deletionsmutante. Vorkulturen beider Stämme wurden bei einer OD_{600} von 3 geerntet und die Proteinkonzentration des zellfreien Kulturüberstandes gemessen. Die mit Trichloressigsäure gefällten Sekretome des Wildtyps und der Mip-Deletionsmutante wurden im Verhältnis von 1:1,34 auf das Gel aufgetragen. Die SDS-PAGE wurde mit Coomassie gefärbt. Als Marker wurde die Page Ruler Prestained Protein Ladder #SM0672 verwendet. Die Mip-Deletionsmutante hatte ein anderes Proteinprofil, bei dem einige Proteine des Sekretoms akkumuliert vorliegen.

Der optische Vergleich der Sekretome (Abb. 30) zeigt, dass in der Spur der *mip*-Deletionsmutante keine zusätzlichen Banden vorhanden sind, die eine Akkumulation zur Folge haben. Was jedoch auffällt ist, dass einige Proteinbanden, wie bei ca. 65 kDa und ca. 58 kDa, eine höhere Intensität haben, als Banden der gleichen Höhe beim Wildtyp. Einige bestimmte Proteine im Sekretom der *mip*-Deletionsmutante lagen akkumuliert vor. Mip hat also einen Einfluss auf das Protein-Profil des Sekretoms. Um sicherzugehen, dass die erhöhte Proteinkonzentration im Überstand nicht durch eine instabile Zellmembran und eine daraus resultierende vorzeitige Lyse der Bakterien hervorgerufen wird, wurde ein Stabilitätsassay durchgeführt. Dafür wurde in drei biologischen Replikaten Proben von stationären Flüssigkulturen des Wildtyps, der *mip*-Deletionsmutante und der Mip-Komplementante entnommen und die Zellzahl durch ausplattieren bestimmt.

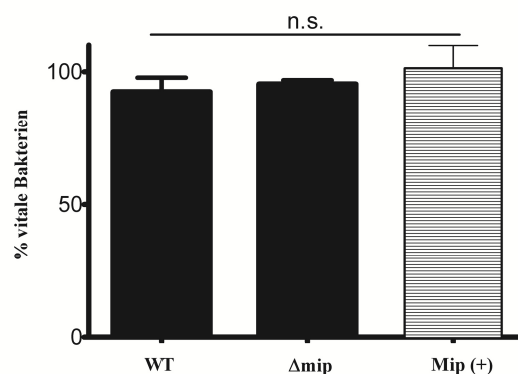


Abbildung 31: Deletion von *mip* führt zu keiner spontanen mechanischen Zelllyse. Die Zellzahl von stationären Flüssigkulturen des Wildtyps, der *mip*-Deletionsmutante und der Mip-Komplementante wurde durch Ausplattieren bestimmt. Anschließend wurden die Bakterien unter den gleichen Bedingungen wie bei der Sekretomanalyse zentrifugiert. Die Zellzahl nach der Zentrifugation wurde ebenfalls durch Ausplattieren ermittelt. Durch die Verrechnung der beiden Zellzahlen wurde der Prozentsatz der Bakterien ermittelt, die nach dem Zentrifugationsschritt noch vital und teilungsfähig waren. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Students *t*-Test berechnet. Bei keinem der Stämme konnte nach der Zentrifugation eine signifikant höhere Lyse der Bakterien festgestellt werden.

Anschließend wurden die Bakterien unter den gleichen Bedingungen wie bei der Sekretomanalyse zentrifugiert. Die Zellzahl nach der Zentrifugation wurde ebenfalls durch Ausplattieren ermittelt. Durch die Verrechnung der beiden Zellzahlen wurde der Prozentsatz der Bakterien ermittelt, die nach dem Zentrifugationsschritt noch vital und teilungsfähig waren. Eine vermehrte Lyse hätte eine geringere vitale Bakterienanzahl nach der Zentrifugation zur Folge. In Abbildung 31 ist zu sehen, dass es zwischen den Stämmen keinen signifikanten Unterschied gibt.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass Mip einen Einfluss auf das Sekretom von Legionellen hat. Die Analyse via SDS-PAGE machte deutlich, dass einige Proteine akkumuliert im zellfreien Überstand vorliegen. Es konnte mit Hilfe eines Wachstumsversuchs ausgeschlossen werden, dass die Akkumulation durch Wachstumsunterschiede hervorgerufen werden. Ebenso wurde ausgeschlossen, dass Mip-defiziente Legionellen schneller lysieren oder eine erhöhte Durchlässigkeit zeigen, da nur bestimmte Proteine akkumuliert waren und da nach der Zentrifugation genauso viele vitale und teilungsfähige Bakterien vorlagen wie davor.

5.4.3 Das Sekretom der *mip*-Deletionsmutante weist zahlreiche akkumulierte Proteine auf

Im nächsten Schritt sollten die akkumulierten Proteine mit Hilfe von 2D-Gelelektrophorese, Orbi-Trap und Synapt identifiziert werden. Jede der drei Methoden besitzt eine Fehleranfälligkeit, weshalb mit nur einer Methode nicht alle akkumulierten Proteine erfasst werden können. Die 2D-Gelelektrophorese ist im Vergleich beispielsweise nicht so sensitiv, hydrophobe Proteine können schlechter gemessen werden und Proteine, die sich nicht im analytischen Fenster gemessen an Molekulargewicht und pI befinden, werden nicht erfasst. Bei der Orbitrap kann es dagegen zu Überlagerungen mancher Peptide durch höher Abundante kommen oder dazu, dass einige Peptide nicht ionisiert werden. Dies führt dazu, dass nicht alle Peptide gemessen werden können. Außerdem können durch den Verdau der Proteine mit Trypsin auch Peptide entstehen, die zu klein sind, um detektiert werden zu können. Bei der Synapt gleichen die Nachteile denen der Orbitrap. Diese Methode eignet sich jedoch besser für quantifizierende Messungen, sodass auch diese Methode angewendet wurde. Der Nachteil bei der Synapt-Messung ist die notwendige Umpufferung der Proteine, was einen Verlust von Proteinen zur Folge haben kann. Um die Ungenauigkeiten aller Methoden zu relativieren und dadurch ein möglichst genaues Ergebnis zu erhalten, wurden die gleichen Sekretome in drei biologischen Replikaten mit allen drei Methoden analysiert. Das Ergebnis war, dass 196 Proteine identifiziert wurden, die in den Sekretomen in unterschiedlichen Konzentrationen vorlagen (Abb. 32). Davon hatten 14 Proteine eine mit der Software SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) vorhergesagte Signalsequenz. Insgesamt lagen 105 Proteine im Sekretom der *mip*-Deletionsmutante signifikant akkumuliert vor und 10 davon hatten eine Signalsequenz (Tab. 11). Zu den akkumulierten Proteinen gehörten zwei Peptidasen, eine Katalase, eine Deacetylase und sechs uncharakterisierte Proteine. Unter den 71 Proteinen, die nur im Überstand der *mip*-Deletionsmutante identifiziert wurden, hatte ein Protein eine Signalsequenz (Tab. 12). Dabei handelte es sich um das hypothetische Protein LpC_0801. Beim Wildtyp lagen insgesamt nur neun Proteine akkumuliert im Sekretom vor, darunter vier mit Signalsequenz (Tab. 13). Der interessanteste der vier Kandidaten ist die Phospholipase C. Nur im Sekretom des Wildtyps kamen insgesamt zehn Proteine vor,

davon eins mit Signalsequenz (Tab. 14). Hierbei handelte es sich um das Mip-Protein, das in der *mip*-Deletionsmutante nicht mehr vorhanden ist.

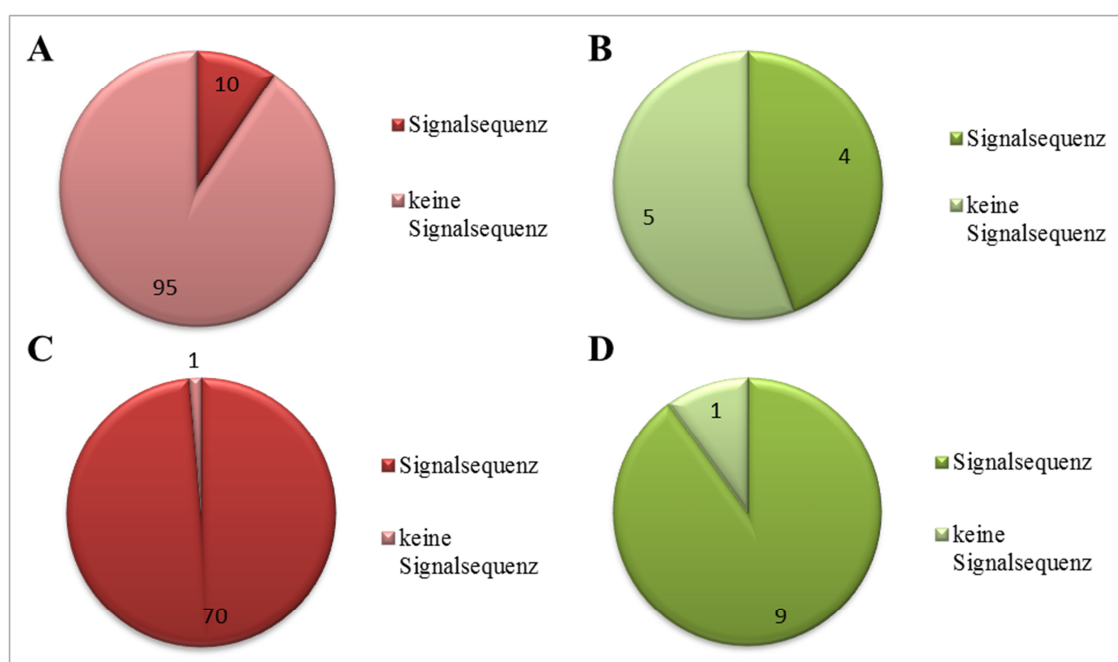


Abbildung 32: Identifizierte Proteine des Sekretoms von *L. pneumophila* Wildtyp und *mip*-Deletionsmutante. (A) Akkumulierte Proteine im Sekretom der *mip*-Deletionsmutante: Insgesamt wurden 105 signifikante Proteine identifiziert, wovon zehn laut SignalP eine Signalsequenz haben. (B) Akkumulierte Proteine im Sekretom des Wildtyps: Insgesamt wurden neun signifikante Proteine identifiziert. Bei vier Proteinen konnte mit SignalP eine Signalsequenz ermittelt werden. (A+B) Bei den identifizierten Proteinen handelt es sich um Kandidaten, die in mindestens einer der drei durchgeführten Methoden als signifikant ermittelt wurden. Die Signifikanz wurde mittels Student's *t*-Test mit Welch's Approximation und mit Bonferroni Berichtigung errechnet. (C) Proteine, die nur im Sekretom der *mip*-Deletionsmutante gefunden wurden: Insgesamt wurden mittels Orbi-Trap 71 Proteine mindestens zweimal ausschließlich im Sekretom von Δmip identifiziert. Davon hatte ein Protein eine Signalsequenz. (D) Proteine, die ausschließlich im Sekretom des Wildtyps gefunden wurden: Insgesamt wurden mittels Orbi-Trap zehn Proteine identifiziert, die in mindestens zwei von drei Fällen nur im Sekretom vom WT vorkamen. Das einzige Protein davon, das eine Signalsequenz hatte, war Mip.

Insgesamt gab es eine große Anzahl von Proteinen, die Mip-abhängig sezerniert werden. Darunter waren Proteine mit und ohne vorhergesagte Signalsequenz. Im

weiteren Verlauf der Arbeit, wurde der Fokus auf Proteine gelegt, die im Sekretom der Mip-Deletionsmutante akkumuliert vorlagen und eine Signalsequenz hatten.

Tabelle 11. Im Sekretom der *mip*-Deletionsmutante akkumulierte Proteine, die mit mindestens einer Methode identifiziert werden konnten, signifikant waren und eine Signalsequenz haben.

Accession	Locus	Beschreibung	SignalP
YP001249609.1	LPC_0267	Zinc metalloprotein	Cs
YP001249613.1	KatG2	Catalase-peroxidase 2	Cs
YP001250971.1	LpC_1689	TPR repeat protein	Cs
YP001251599.1	LpC_2331	Uncharacterized protein	Cs
YP001251821.1	LPC_2560	Opacity protein-like surface antigen	Cs
YP001251847.1	LPC_2586	IcmL-like protein	Cs
YP001252423.1	LpC_3190	Uncharacterized protein	Cs
YP001250771.1	LpC_1476	Polysaccharide deacetylase	Cs
YP001251686.1	LpC_2419	Uncharacterized protein	Cs
YP001252333.1	LpC_3100	Aminopeptidase	Cs

Tabelle 12. Protein, das mittels Orbitrap nur im Sekretom der *mip*-Deletionsmutante identifiziert wurde und eine Signalsequenz trägt

Accession	Locus	Beschreibung	SignalP
YP001250123.1	LPC_0801	hypothetical protein	Cs

Tabelle 13. Im Sekretom des Wildtyps akkumulierte Proteine, die mit mindestens einer Methode identifiziert werden konnten, signifikant waren und eine Signalsequenz haben.

Accession	Locus	Beschreibung	SignalP
YP001249436.1	LpC_0090	Uncharacterized protein	Cs
YP001250192.1	LpC_0870	Phospholipase C	Cs
YP001251717.1	Ttg2D	Signal peptide protein, toluene tolerance protein Ttg2D	Cs
YP001251584.1	LpC_2316	Ecto-ATP diphosphohydrolase II	Cs

Tabelle 14. Protein, das mittels Orbitrap nur im Sekretom des Wildtyps identifiziert wurde und eine Signalsequenz trägt.

Accession	Locus	Beschreibung	SignalP
YP001251764.1	mip	macrophage infectivity potentiator	Cs

5.4.4 Analyse des Mip-abhängig sezernierten hypothetischen Proteins LpC_0801

Aus der Liste der Mip-abhängig sezernierten Proteine wurden zwei Proteine, die laut SignalP eine Cleavage Site besitzen, für weitere Analysen ausgewählt. Das erste Mip-abhängig sezernierte Protein, welches Bestandteil dieser Studie war, ist das

123 Aminosäuren lange LpC_0801. Dieses Protein wurde im Sekretom von zwei der drei Replikate von *Amip* identifiziert, aber nicht im Überstand der Wildtyp-Kulturen. LpC_0801 ist als *hypothetical protein* annotiert und besteht zu 6,4 % aus Prolin. Dieses Protein kommt mit einer Übereinstimmung von 100 % auch in *L. pneumophila pneumophila* und *L. pneumophila Philadelphia* vor und mit einer Übereinstimmung von 99 % in *L. pneumophila* Lens und *L. pneumophila* Paris. *L. drancourtii* besitzt ein Protein, welches zu 64 % mit LpC_0801 übereinstimmt, *L. longbeachae* eins mit 50 % Übereinstimmung und *L. hackeliae* besitzt kein ähnliches Gen. Die höchste Übereinstimmung zu einer anderen Spezies, besteht mit 53 % zu einem hypothetischen Protein aus *Flouribacter dumoffii*. Laut pSORT ist LpC_0801 ebenfalls in der äußeren Membran oder dem Periplasma lokalisiert, wurde mit Hilfe der Sekretomstudien aber extrazellulär nachgewiesen.

5.4.4.1 Herstellung der *lpC_0801*-Deletionsmutante

Um das hypothetische Protein LpC_0801 charakterisieren zu können, wurde in Zusammenarbeit mit Stefan Tran (Tran, 2013) eine Deletionsmutante in *L. pneumophila* Corby hergestellt. Die 5'- und 3'-flankierenden Regionen (869 bp und 908 bp) wurden mit Überhängen amplifiziert (Primer: 0801_UFF und 0801_UFR für 5'-Flanke, 0801_DFF und 0801_DFR für 3'-Flanke) und zusammen mit der *nptI*-Kanamycin-Kassette (816 bp) durch eine Joining-PCR (Primer: 0801_UFF und 0801_DFR) und zu einem Deletions-Konstrukt verbunden. In Abbildung 33 sind die Agarose-Gelfotos der Konstrukte zu sehen. Das Produkt der 5'-flankierenden Sequenz (Abb. 33 A) hatte eine Größe von ca. 800 bp. Die Größe stimmte mit der im Vorfeld ermittelten Konstruktlänge von 870 bp überein. Auch die Größe der 3'-Flanke, die bei ca. 900 bp lag, passte zu den vorhergesagten 908 bp. Die Amplifikate und die Kanamycin-Kassette wurden durch eine Joining-PCR verbunden (Abb. 33 B). Die nachgewiesene Größe lag bei ca. 2,5 kb, was der ermittelten Länge von 2593 bp entsprach. Das Deletionskonstrukt wurde mit einem pGEMT-easy Vektor ligiert und anschließend in kompetente *E.coli* DH10 β gebracht. Aus einem positiven Klon wurde das intakte Plasmid reisoliert und als Template für die erneute Amplifikation des Joining-Konstrukts verwendet. Das Amplifikat wurde *L. pneumophila* Corby in der exponentiellen Wachstumsphase beigefügt. Die DNA wurde mit Hilfe der natürlichen Kompetenz in die Legionellen

aufgenommen und das GOI durch homologe Rekombination ersetzt. Anschließend wurde *L. pneumophila* Corby $\Delta 0801$ durch PCR und Sequenzierung verifiziert und für weitere Studien verwendet.

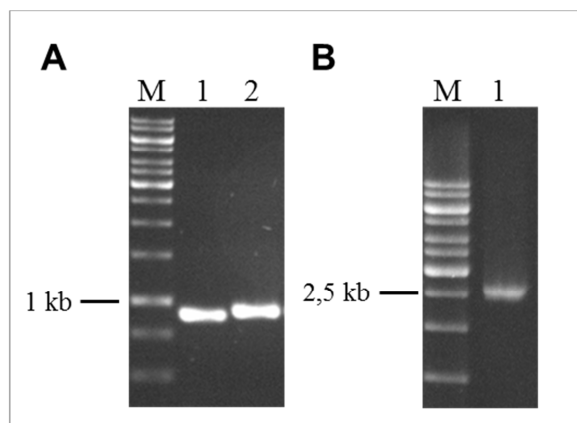


Abbildung 33: Amplifikation der Deletions-Konstrukte mit Hilfe von PCR. Dargestellt ist ein 1 %-iges Agarosegel nach Ethidiumbromidfärbung. Als Marker wurde die 1 kb GeneRuler® DNA-Ladder von Thermo Scientific verwendet. (A) 1: Amplifikation der 870 bp großen 5'-Flanke von *LpC_0801*. 2: Amplifikation der 908 bp großen 3'-Flanke von *LpC_0801*. (C) 1: Zusammengefügtes Produkt aus 5'-Flanke (869 bp), Kanamycin-Kassette (816 bp) und 3' Flanke (908 bp) mit einer Gesamtgröße von 2593 bp.

5.4.4.2 Komplementation der *lpC_0801*-Deletionsmutante

Um verifizieren zu können, dass beobachtete Phänotypen der *lpC_0801*-Deletionsmutante auf das Protein LpC_0801 zurückzuführen sind und nicht auf etwaige Sekundäreffekte oder Rekombinationsfehler, wurden eine Komplementante erstellt. Dafür wurde das Gen *LpC_0801* mit Hilfe einer PCR amplifiziert. Der Forward-Primer 0801_F1 wurde so entworfen, dass er 236 bp vor dem Startcodon des GOI bindet, damit der natürliche Promotor im Klonierungskonstrukt integriert ist. Die exakte Lage des Promotors ist unbekannt. Durch die Inklusion eines großen Bereichs vor dem Gen, durch die Beschaffenheit der Region und durch die Promotor-Vorhersage mit der Software Promoter 2.0 Prediction (<http://www.cbs.dtu.dk/services/Promoter/>) wird aber von der Anwesenheit des Promotors innerhalb der 236 bp ausgegangen. Als reverser Primer wurde 0801_R1 verwendet.

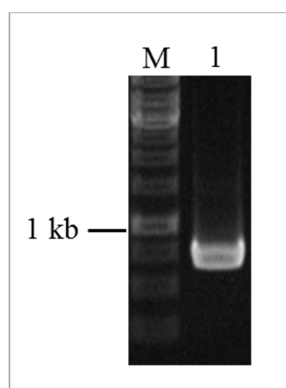


Abbildung 34: Amplifikation des Komplementations-Konstrukts mit Hilfe von PCR. Dargestellt ist ein 1 %-iges Agarosegel nach Ethidiumbromidfärbung. Als Marker wurde die 1 kb GeneRuler® DNA-Ladder von Thermo Scientific verwendet. 1: Amplifikation des *LpC_0801*-Konstrukts (614 bp) in *L. pneumophila* Corby *LpC_0801* (+) zur Verifikation der Komplementante.

Des Weiteren wurden die Primer auch bei diesem Gen so gewählt, dass das Komplementationsgen in die entgegengesetzte Richtung zum im Vektor vorhandenen T7-Promotor eingebaut wurde. So konnte die Transkription des Gens nur über den natürlichen Promotor initiiert werden. Das amplifizierte Gen (614 bp) wurde in einen pBCKS(+)-Vektor kloniert. Das Komplementations-Konstrukt wurde per Elektroporation in die *lpC_0801*-Deletionsmutante eingebracht. Die Komplementante wurde mit Hilfe von PCR (Abb. 34) und Sequenzierung (Anhang) verifiziert. Im Komplementationsstamm wurde das Gen *LpC_0801* inklusive Promotor-Bereich (614 bp) mit einer PCR nachgewiesen.

5.4.4.3 *LpC_0801* hat keinen Effekt auf die intrazelluläre Replikation in *A. castellanii*

Das Mip-abhängig sezernierte Protein *LpC_0801* ist als hypothetisches Protein annotiert und ist bis dato unerforscht. Für die nähere Charakterisierung wurden Infektionsversuche mit der *lpC_0801*-Deletionsmutante in *A. castellanii* durchgeführt. Als Kontrollstämme wurden der Wildtyp und die replikationsgeschwächten Stämme *dotA*⁻ und Δ *mip* verwendet. Dafür wurden 5×10^5 Acanthamoeben/ ml mit einer MOI von 0,02 infiziert. Nach 2, 24 und 48 h wurde die Anzahl der intrazellulären Bakterien durch Ausplattieren auf BCYE-Agar ermittelt. In Abbildung 35 ist die intrazelluläre

Replikation der verschiedenen Stämme dargestellt. Der Wildtyp vermehrte sich über die Zeitpunkte konstant. Nach zwei Stunden wurde eine Zellzahl von 1×10^4 cfu/ ml ermittelt, nach 24 h stieg diese auf 1×10^6 cfu/ ml und nach 48 h auf 3×10^7 cfu/ ml. Die Vermehrung wurde als signifikant verifiziert. Der Stamm *dotA*⁻ blieb zwischen 2 und 24 h dagegen bei ca. 1×10^4 cfu/ ml, und vermehrt sich nach 48 h leicht, jedoch nicht signifikant auf eine Zellzahl von 2×10^5 cfu/ ml.

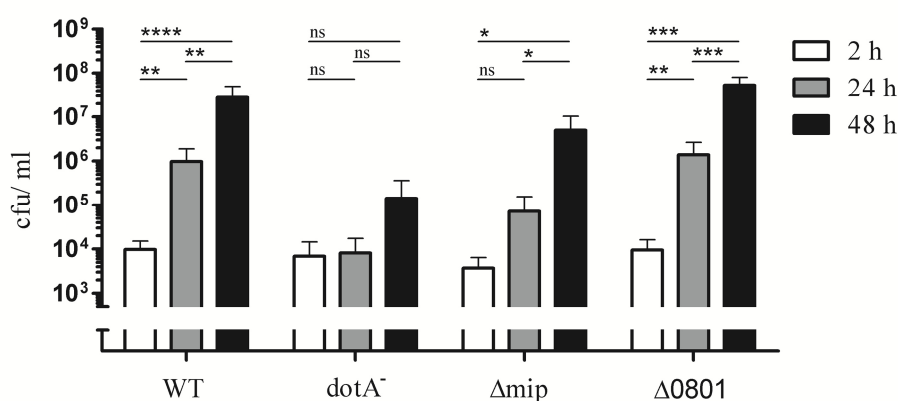


Abbildung 35: Infektion von *A. castellanii* mit Legionellen. *A. castellanii* wurde mit dem LpC Wildtyp, *dotA*⁻, Δmip und $\Delta 0801$ infiziert. Die Ansätze wurden nach 2 h, 24 h und 48 h ausplattiert und die cfu-Werte bestimmt. Die Signifikanz wurde mit einem einseitigen Student's *t*-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 % errechnet (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$). Die *lpC_0801*-Deletionsmutante spielte für die intrazelluläre Replikation keine Rolle.

Die *mip*-Deletionsmutante vermehrte sich zwischen 2 h und 24 h nicht signifikant 17,5-fach auf 7×10^4 cfu / ml. Von 24 h auf 48 h multiplizierte sie sich auf einen cfu-Wert von 6×10^6 pro ml. Sowohl die Vermehrung zwischen 24 h und 48 h als auch die zwischen 2 h und 48 h war signifikant (* $p \leq 0,05$). Beide Kontrollstämme zeigten im Vergleich zum Wildtyp eine schlechtere intrazelluläre Replikation, wobei *dotA*⁻ den größeren Defekt zeigte. Wurde im Vergleich dazu die *lpC_0801*-Deletionsmutante betrachtet, fiel auf, dass diese sich wie der Wildtyp vermehrte. Nach 2 h wurde ein cfu-Wert von 1×10^4 / ml ermittelt. Nach 24 h stieg die Zellzahl signifikant auf 1×10^6 cfu/ ml (** $p \leq 0,01$). Nach 48 h vermehrte sich die Deletionsmutante 80-fach im Vergleich zum 24 h-Wert, erreichte also ein cfu-Wert von 8×10^7 / ml. Dieser

Vermehrungsschritt und die gesamte Vermehrung zwischen 2 h und 48 h waren ebenso signifikant ($***p \leq 0,001$).

Parallel wurde *A. castellanii* mit Komplementationsstämmen infiziert. WT (+) entsprach dem Wildtyp komplementiert mit einem leeren pBCKS (+)-Vektor. Dieser Stamm wurde verwendet, um durch Chloramphenicol hervorgerufene Wachstumsdefizite zu relativieren. Die Mip-Komplementante ist eine etablierte Komplementante, die ebenfalls als Vergleichsstamm herangezogen wurde. Die LpC_0801-Komplementante wurde im Rahmen dieser Arbeit generiert.

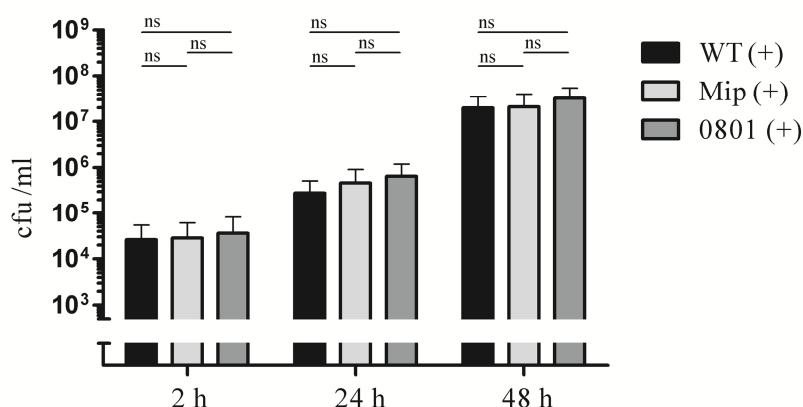


Abbildung 36: Infektion von *A. castellanii* mit *Legionella*-Komplementanten. *A. castellanii* wurde mit dem LpC Wildtyp (+), Mip (+) und 0801 (+) infiziert. Die Ansätze wurden nach 2 h, 24 h und 48 h ausplattiert und die cfu-Werte bestimmt. Die Signifikanz wurde mit einem einseitigen Student's *t*-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 % errechnet (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$). Die LpC_0801-Komplementante unterschied sich in der Replikation nicht von LpC Wildtyp (+) und Mip (+).

Die Ergebnisse der Infektion sind in Abbildung 36 dargestellt. Alle drei Stämme vermehrten sich ohne signifikanten Unterschied zwischen 2 h, 24 h und 48 h. Nach 2 h hatten alle Komplementanten einen cfu-Wert von ca. 3×10^4 / ml, nach 24 h lag dieser bei ca. 6×10^5 / ml und nach 48 h bei ca. 2×10^7 / ml. Die intrazelluläre Replikation der beiden Komplementanten war mit der des mit Leervektor komplementierten Wildtyps vergleichbar.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass LpC_0801 keine Rolle bei der intrazellulären Replikation in *A. castellanii* spielt.

5.4.4.4 LpC_0801 hat keinen Effekt auf die intrazelluläre Replikation in Makrophagen

Das hypothetische Protein LpC_0801 kommt nur im Überstand der Mip-Mutante vor. Nachdem im Rahmen dieser Arbeit gezeigt wurde, dass dieses Protein keinen Einfluss auf die intrazelluläre Replikation in *A. castellanii* hat, sollte das Replikationsverhalten der *lpC_0801*-Deletionsmutante auch in THP-1-Makrophagen untersucht werden. Als Kontrollstamm für den natürlichen Infektionsverlauf wurde der Wildtyp verwendet. Als interne Kontrolle diente der stark attenuierte Stamm *dotA*⁻. Als weiterer Vergleich wurde die replikationsgeschwächte *mip*-Deletionsmutante herangezogen, in deren Sekretom LpC_0801 vermehrt vorkommt. Für die Durchführung wurden 5×10^5 Zellen/ ml mit einer MOI von 1 infiziert.

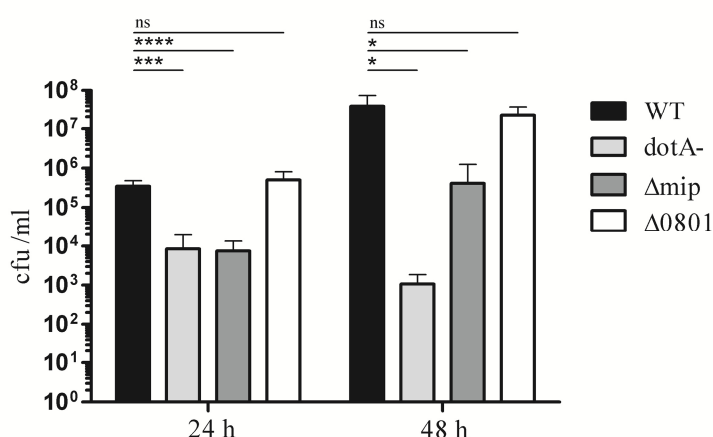


Abbildung 37: Infektion von THP-1-Makrophagen mit Legionellen. THP-1-Makrophagen wurden mit dem LpC Wildtyp, *dotA*⁻, Δmip und $\Delta 0801$ infiziert. Die Ansätze wurden nach 24 h und 48 h ausplattiert und die cfu-Werte bestimmt. Die Signifikanz wurde mit einem einseitigen Student's *t*-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 % errechnet (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$). LpC_0801 spielte für die intrazelluläre Replikation keine Rolle.

Nach 24 h und 48 h wurde die Anzahl der intrazellulären Bakterien durch Ausplattieren auf BCYE-Agar ermittelt. In Abbildung 37 ist die intrazelluläre Replikation der verschiedenen Stämme dargestellt. Beim Vergleich der Stämme nach 24 h fiel auf, dass sich der Wildtyp und $\Delta 0801$ auf einen cfu-Wert von ca. 5×10^5 / ml vermehrt hatte. Die replikationsgeschwächten Mutanten *dotA*⁻ und Δmip kamen dagegen nur auf einen cfu-

Wert von ca. 9×10^3 / ml. Auch nach 48 h vermehrte sich die *lpC_0801*-Deletionsmutante gleichermaßen wie der Wildtyp. Beide Stämme erreichten einen cfu-Wert von ca. 2×10^7 / ml, was im Vergleich zum 24 h-Wert einer 40-fachen Vermehrung entsprach. Der cfu-Wert der *DotA*-Mutante wurde auf 1×10^3 / ml dezimiert und die *Mip*-Mutante vermehrte sich wieder etwas besser und erreichte einen cfu-Wert von 4×10^5 / ml. Die *lpC_0801*-Deletionsmutante hatte verglichen mit dem Wildtyp keinen Replikationsnachteil über die gesamte Infektionsdauer von 48 h. Zusammenfassend wurde gezeigt, dass *LpC_0801* keine Rolle bei der intrazellulären Replikation in THP-1-Makrophagen spielt.

5.4.4.5 *LpC_0801* hat keinen Effekt auf die intrazelluläre Replikation in HLTEs

Nachdem die Deletion von *LpC_0801* keine verringerte Replikation in THP-1-Makrophagen zur Folge hatte, wurde der Infektionsverlauf im Zellverband der HLTEs analysiert. Auch hier wurden der Wildtyp und die replikationsgeschwächten Stämme *dotA⁻* und Δmip als Kontrollstämme verwendet. Das explantierte, humane Lungengewebe wurde in kleine Stückchen geschnitten. Pro Well befüllt mit 2 ml Legionellensuspension (1×10^7 cfu/ ml) wurde ein Lungenstückchen hinzugegeben. Nach 2, 24 und 48 h wurde das HLTE-Stück gewogen, homogenisiert und die Anzahl der intrazellulären Bakterien durch Ausplattieren auf BCYE-Agar bestimmt.

In Abbildung 38 ist die intrazelluläre Replikation der verschiedenen Stämme dargestellt. Der Wildtyp vermehrte sich über die Zeitpunkte konstant. Nach zwei Stunden wurde eine Zellzahl von 4×10^6 cfu/ g Gewebe ermittelt, nach 24 h stieg diese auf 2×10^7 cfu/ g Gewebe und nach 48 h auf 7×10^7 cfu/ g Gewebe. Die Vermehrung wurde als signifikant verifiziert. Der Stamm *dotA⁻* lag nach 2 h dagegen bei ca. 6×10^6 cfu/ g Gewebe, multiplizierte sich nach 24 h leicht auf 8×10^6 cfu/ g Gewebe und nach 48 h auf ca. $1,3 \times 10^7$ cfu/ g Gewebe. Die Vermehrung der *DotA*-Mutante war zu keinem Zeitpunkt signifikant. Die *mip*-Deletionsmutante vermehrte sich zwischen 2 h und 24 h nicht signifikant 2,5-fach auf ca. $1,5 \times 10^7$ cfu/ g Gewebe.

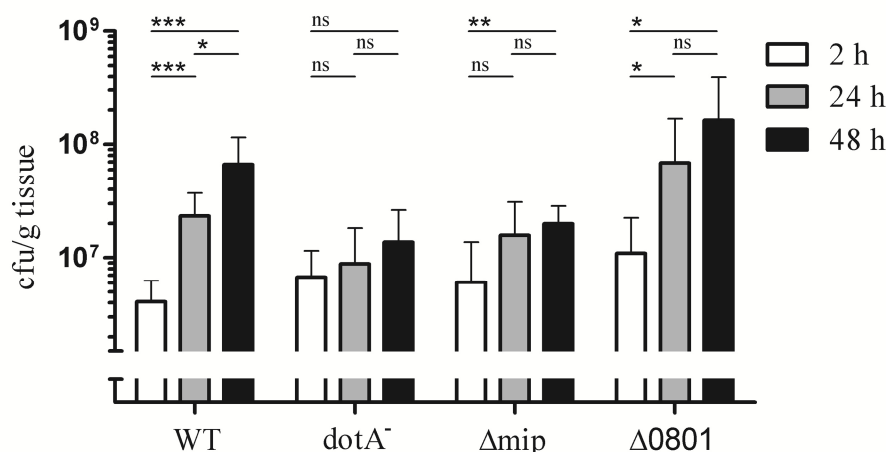


Abbildung 38: Infektion von HLTEs mit Legionellen. HLTEs wurden mit dem LpC Wildtyp, *dotA*⁻, *Δmip* und *Δ0801* infiziert. Die Ansätze wurden nach 2 h, 24 h und 48 h homogenisiert, ausplattiert und die cfu-Werte bestimmt (n=5). Die Signifikanz wurde mit einem einseitigen Student's *t*-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 % errechnet (**p* ≤ 0,05; ***p* ≤ 0,01; ****p* ≤ 0,001). LpC_0801 spielte für die intrazelluläre Replikation keine Rolle.

Von 24 h auf 48 h replizierte sie sich geringfügig auf einen cfu-Wert von 2×10^7 / g Gewebe. Sowohl die Vermehrung zwischen 2 h und 24 h als auch die zwischen 24 h und 48 h war nicht signifikant. Die gesamte Vermehrung zwischen 2 h und 24 h wurde jedoch als signifikant verifiziert (***p* ≤ 0,01). Beide Kontrollstämmen zeigten im Vergleich zum Wildtyp eine schlechtere intrazelluläre Replikation. Wurde im Vergleich dazu die *lpC_0801*-Deletionsmutante betrachtet, fiel auf, dass diese sich sogar etwas stärker als der Wildtyp vermehrte. Nach 2 h wurde ein cfu-Wert von 1×10^7 / g Gewebe ermittelt. Nach 24 h stieg die Zellzahl signifikant auf 6×10^7 cfu/ g Gewebe (**p* ≤ 0,05). Nach 48 h vermehrte sich die Deletionsmutante 2,5-fach im Vergleich zum 24 h-Wert, erreichte also einen cfu-Wert von 6×10^7 / g Gewebe. Dieser Vermehrungsschritt ist aufgrund der hohen Standardabweichung nicht signifikant. Die gesamte Vermehrung zwischen 2 h und 48 h wurde jedoch als signifikant verifiziert (**p* ≤ 0,05). Zusammenfassend wurde gezeigt, dass LpC_0801 keine Rolle bei der intrazellulären Replikation in HLTEs spielt.

5.4.5 Analyse des Mip-abhängig sezernierten hypothetischen Proteins LpC_2560

Als zweites akkumuliertes Protein aus der Liste der Mip-abhängig sezernierten Proteine wurde das hypothetische Protein LpC_2560 für weitere Analysen ausgewählt. Dieses Protein ist laut Orbi-Trap Analyse das Protein, welches unter denen mit Cleavage Site am meisten in der Mutante akkumuliert war (2,6-fach). Es ist als *opacity protein-like surface antigen* annotiert und hat eine Länge von 212 Aminosäuren. Dieses Protein war bisher kein Gegenstand wissenschaftlicher Studien, sodass es keinerlei Erkenntnisse über Struktur, Funktion und Lokalisation gab. Bioinformatische Analysen ergaben, dass LpC_2560 zu 4,2 % aus Prolinen besteht. Der Vergleich der Gensequenz in NCBI-BLAST ergab, dass dieses Protein mit einer Übereinstimmung von 99 % auch in *L. pneumophila pneumophila*, *L. pneumophila Philadelphia*, *L. pneumophila Lens* und *L. pneumophila Paris* vorkommt. *L. drancourtii* hat ein Protein, was zu 59 % mit LpC_2560 übereinstimmt, *L. longbeachae* eins mit 55 % Übereinstimmung und *L. hackeliae* besitzt kein ähnliches Gen. Laut Protein-BLAST gehört LpC_2560 zu der *outer membrane channels superfamily*. Die höchste Übereinstimmung zu einem Protein einer anderen Spezies hat es mit dem hypothetischen Protein aus *Flouribacter dumoffii* (51 %). Laut pSORT ist es in der äußeren Membran oder im Periplasma lokalisiert. In unseren Sekretomstudien wurde es jedoch im Überstand nachgewiesen.

5.4.5.1 Herstellung der *lpC_2560*-Deletionsmutante

Um das hypothetische Protein LpC_2560 charakterisieren zu können, wurde in Zusammenarbeit mit Stefan Tran (Tran, 2013) eine Deletionsmutante in *L. pneumophila* Corby hergestellt. Zu Beginn wurden die 5' und 3' flankierenden Regionen (1641 bp und 1096 bp) mit Überhängen amplifiziert (Primer: 2560_UFF und 2560_UFR für 5'-Flanke, 2560_DFF und 2560_DFR für 3'-Flanke) und mit einer Kanamycin-Kassette zu einem Deletions-Konstrukt verbunden (Primer: 2560_UFF und 2560_DFR). In Abbildung 39 sind die Amplifikate der Konstrukte dargestellt. Das Produkt der 5'-flankierenden Sequenz (Abb. 39 A) lief bei einer Größe von ca. 1600 bp. Die ermittelte Konstruktgröße lag bei 1641 bp. Die vorhergesagte Größe der 3'-Flanke von 1096 bp passte zu der beobachteten Bande bei ca. 1100 bp (Abb. 39 B). Die beiden Amplifikate

wurden durch eine Joining-PCR mit einer Kanamycin-Kassette (*nptI* = 816 bp) verbunden. Die Größe des Fusionsproduktes lag bei ca. 3,5 kb, was mit der ermittelten Länge von 3553 bp übereinstimmt.

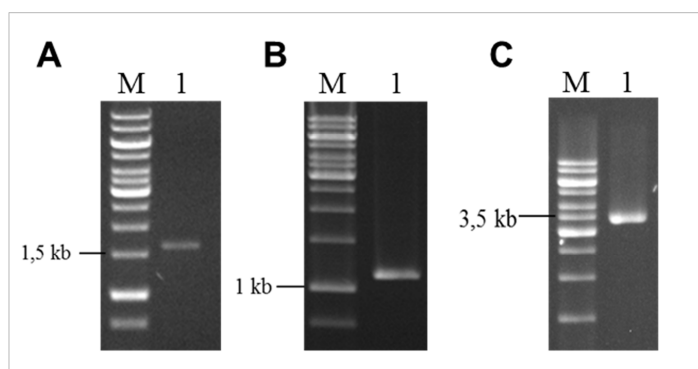


Abbildung 39: Amplifikation der Deletions-Konstrukte mit Hilfe von PCR. Dargestellt ist ein 1 %-iges Agarosegel nach Ethidiumbromidfärbung. Als Marker wurde die 1 kb GeneRuler® DNA-Ladder von Thermo Scientific verwendet. (A) 1: Amplifikation der 1641 bp großen 5'-Flanke von *LpC_2560*. (B) 1: Amplifikation der 1096 bp großen 3'-Flanke von *LpC_2560*. (C) 1: Zusammengefügtes Produkt aus 5'-Flanke (1641 bp), Kanamycin-Kassette (816 bp) und 3'-Flanke (1096 bp) mit einer Gesamtgröße von 3553 bp.

Nachdem das Joining-Konstrukt in einen pGEMT-easy Vektor kloniert wurde, wurde es in kompetente *E.coli* DH10 β eingebracht. Aus einem positiven Klon wurde das intakte Plasmid reisoliert und als Template für die erneute Amplifikation des Joining-Konstrukts verwendet. Zu in der exponentiellen Wachstumsphase befindlichen *L. pneumophila* Corby wird das Amplifikat hinzugegeben, damit die DNA mit Hilfe der natürlichen Kompetenz aufgenommen wird. Das GOI wird dann durch homologe Rekombination ersetzt. Schlussendlich wurde eine *L. pneumophila* Corby *LpC_2560*-Mutante durch PCR und Sequenzierung verifiziert und für weitere Studien verwendet.

5.4.6 Komplementation der *lpC_2560*-Deletionsmutante

Um beobachtete Phänotypen zu verifizieren, wurde Komplementante erstellt. Dafür wurde das Gen *LpC_2560* mit Hilfe einer PCR amplifiziert.

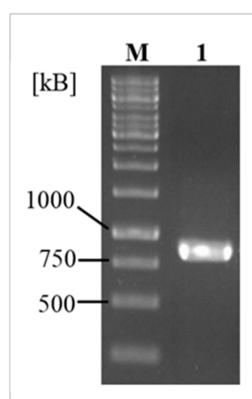


Abbildung 40: Amplifikation des Komplementations-Konstrukts mit Hilfe von PCR. Dargestellt ist ein 1 %-iges Agarosegel nach Ethidiumbromidfärbung. Als Marker wurde die 1 kb GeneRuler® DNA-Ladder von Thermo Scientific verwendet. 1: Amplifikation des *LpC_2560*-Konstrukts (844 bp) in *L. pneumophila* Corby *LpC_2560* (+) zur Verifikation der Komplementante.

Der verwendete Forward-Primer 2560_F1 bindet 208 bp vor dem Startcodon des GOI, damit der natürliche Promotor ebenfalls im amplifizierten Konstrukt enthalten ist. Die Lage des Promotors ist nicht bekannt. Mit Hilfe der Inklusion eines großen Bereichs vor dem Gen, durch die Beschaffenheit der Region und durch die Promotor-Vorhersage mit der Software Promoter 2.0 Prediction (<http://www.cbs.dtu.dk/services/Promoter/>) wurde die Anwesenheit des Promotors innerhalb der 208 bp als gegeben vorausgesetzt. Als reverser Primer wurde 2560_R1 verwendet. Außerdem wird durch die Verwendung dieser Primer das Komplementationsgen entgegengesetzt zum im Vektor vorhandenen T7-Promotor abgelesen. Damit wird die ausschließliche Initiierung der Transkription des Gens über den natürlichen Promotor gewährleistet. Das amplifizierte Konstrukt mit einer Größe von 844 bp wurde in einen pBCKS(+)-Vektor eingefügt und mittels Elektroporation in die *lpC_2560*-Deletionsmutante eingebracht. Die Komplementante wurde mit Hilfe von PCR (Abb. 40) und Sequenzierung verifiziert. Im Komplementationsstamm konnte das Gen *LpC_2560* inklusive Promotor-Bereich mit einer Größe von 847 bp mittels PCR nachgewiesen werden.

5.4.6.1 LpC_2560 beeinflusst die intrazelluläre Replikation in *A. castellanii*

Das Mip-abhängig sezernierte Protein LpC_2560 ist als hypothetisches Protein annotiert und ist bis dato unerforscht. Für die nähere Charakterisierung wurden Infektionsversuche mit der *lpC_2560*-Deletionsmutante in *A. castellanii* durchgeführt. Als Kontrollstämme wurden der Wildtyp und die replikationsgeschwächten Stämme *dotA*⁻ und Δmip verwendet. Für die Durchführung wurden 5×10^5 Acanthamoeben/ ml mit einer MOI von 0,02 infiziert. Nach 2 h, 24 h und 48 h wurde die Anzahl der intrazellulären Bakterien durch Ausplattieren auf BCYE-Agar ermittelt. In Abbildung 41 ist der Verlauf der intrazellulären Replikation verschiedener Stämme über die Zeit dargestellt. Der Wildtyp zeigte im zeitlichen Verlauf eine konstante Vermehrung. Der ermittelte Wert lag nach zwei Stunden bei 1×10^4 cfu/ ml und stieg nach 24 h auf 1×10^6 cfu/ ml. Nach 48 h wurde ein cfu-Wert von 3×10^7 / ml erreicht. Die Vermehrung war insgesamt signifikant. Der Stamm *dotA*⁻ stagnierte dagegen zwischen 2 und 24 h bei ca. 1×10^4 cfu/ ml, und replizierte sich nach 48 h nicht signifikant auf 2×10^5 cfu/ ml. Die *mip*-Deletionsmutante zeigte zwischen 2 h und 24 h eine nicht signifikante 17,5 fache Vermehrung auf 7×10^4 cfu/ ml. Von 24 h auf 48 h steigerte sich der cfu-Wert auf 6×10^6 / ml. Sowohl die Vermehrung zwischen 24 h und 48 h als auch die zwischen 2 h und 48 h wurde als signifikant verifiziert (* $p \leq 0,05$). Die Kontrollstämme replizierten sich im Vergleich zum Wildtyp schlechter. Den größten Defekt bei der intrazellulären Replikation zeigte *dotA*⁻. Die Replikation der *lpC_2560*-Deletionsmutante ähnelte insgesamt der von Δmip . Nach 2 h wurde ein cfu-Wert von 8×10^3 / ml erreicht. Nach 24 h vermehrte sich die Zellzahl signifikant 3,75-fach auf 3×10^4 cfu/ ml (* $p \leq 0,05$). Nach 48 h stieg die cfu der Deletionsmutante 100-fach im Vergleich zum 24 h-Wert auf eine cfu von 3×10^6 / ml. Dieser Vermehrungsschritt und die gesamte Vermehrung zwischen 2 h und 48 h waren signifikant (* $p \leq 0,05$). Es fällt auf, dass vor allem die Vermehrung in der frühen replikativen Phase bei Δmip und $\Delta 2560$ im Vergleich zum Wildtyp verringert ist. Zwischen 24 h und 48 h steigt die Replikationsrate wieder leicht, aber der totale cfu-Wert der beiden Stämme ist dennoch 5- bis 10-fach geringer als der des Wildtyps.

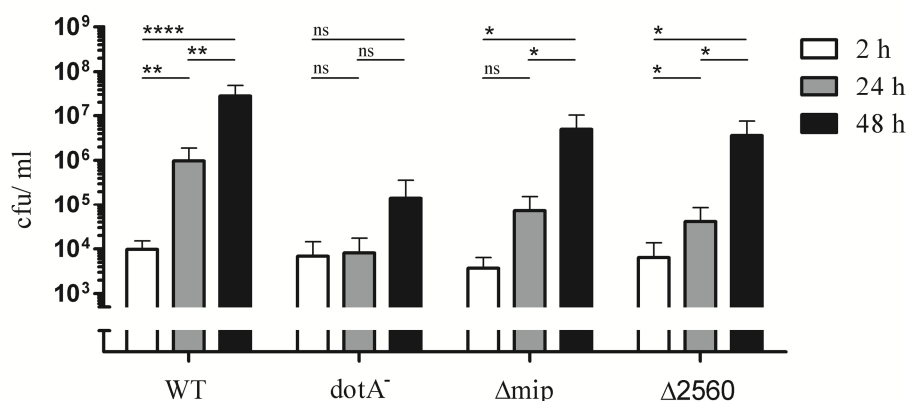


Abbildung 41: Infektion von *A. castellanii* mit Legionellen. *A. castellanii* wurde mit dem LpC Wildtyp, *dotA*⁻, *Δmip* und *Δ2560* infiziert. Die Ansätze wurden nach 2 h, 24 h und 48 h ausplattiert und die cfu-Werte bestimmt. Die Signifikanz wurde mit einem einseitigen Student's *t*-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 % errechnet (**p* ≤ 0,05; ***p* ≤ 0,01; ****p* ≤ 0,001). Die *lpC_2560*-Deletionsmutante zeigte eine verringerte intrazelluläre Replikation.

Zusätzlich wurde das Wirtssystem *A. castellanii* mit den Komplementationsstämmen WT (+), Mip (+) und 2560 (+) infiziert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 42 dargestellt. Alle Komplementanten wiesen nach 2 h einen cfu-Wert von ca. 3×10^4 / ml auf. Nach 24 h vermehrte sich WT (+) 10-fach auf einen cfu-Wert von 3×10^5 / ml, die Mip-Komplementante 16,6-fach auf einen cfu-Wert von 5×10^5 / ml und die LpC_2560-Komplementante 3,3-fach auf 1×10^5 cfu/ml. Der Unterschied zwischen den Zellzahlen der Komplementanten war nach 24 h nicht signifikant. Nach 48 h erreichte die LpC_2560-Komplementante mit ca. 2×10^6 cfu/ ml jedoch eine signifikant geringere Zellzahl als WT (+) und Mip (+) mit ca. 2×10^7 cfu/ ml. LpC_2560 (+) zeigte im Vergleich zu den anderen Komplementanten zwischen 24 h und 48 h zwar Wachstumsschwierigkeiten, vermehrte sich aber dennoch 20-fach. Da der Replikationsnachteil der LpC_2560-Deletionsmutante nach 24 h beobachtet wurde und die Replikation zu diesem Zeitpunkt komplementiert werden konnte, war die Komplementation insgesamt dennoch erfolgreich.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass LpC_2560 wichtig für die frühe Phase der intrazellulären Replikation in *A. castellanii* ist und somit als neuer Virulenzfaktor von *L. pneumophila* identifiziert wurde.

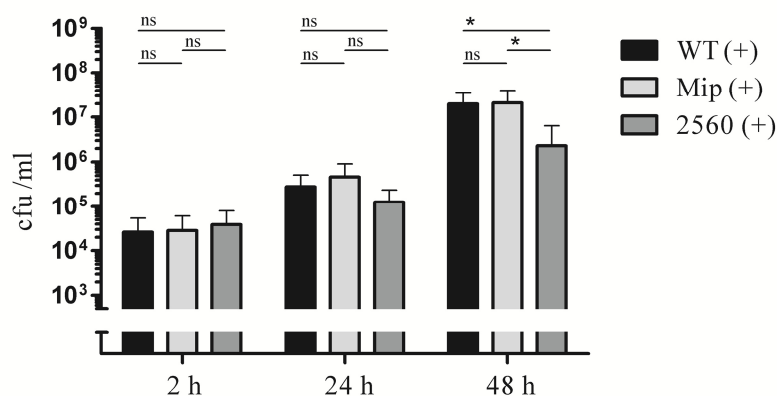


Abbildung 42: Infektion von *A. castellanii* mit *Legionella*-Komplementanten. *A. castellanii* wurde mit dem LpC Wildtyp (+), Mip (+) und 2560 (+) infiziert. Die Ansätze wurden nach 2 h, 24 h und 48 h ausplattiert und die cfu-Werte bestimmt. Die Signifikanz wurde mit einem einseitigen T-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 % errechnet (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$). Die LpC_2560-Komplementante unterschied sich in der Replikation nach 24 h nicht von LpC Wildtyp (+) und Mip (+), hat nach 48 h aber einen leichten Replikationsnachteil.

5.4.6.2 LpC_2560 beeinflusst die intrazelluläre Replikation in Makrophagen

Das im Überstand der Mip-Mutante akkumulierte Protein LpC_2560 beeinflusst die intrazelluläre Replikation in *A. castellanii*. Aus diesem Grund sollte auch das Replikationsverhalten der *lpC_2560*-Deletionsmutante in THP-1-Makrophagen untersucht werden. Als Kontrollstämme wurden erneut der Wildtyp, Δmip und $dotA^-$ verwendet. Für die Durchführung wurden 5×10^5 Zellen/ml mit einer MOI von 1 infiziert. Nach 24 h und 48 h wurde die Anzahl der intrazellulären Bakterien durch Ausplattieren auf BCYE-Agar ermittelt. In Abbildung 43 ist die intrazelluläre Replikation der verschiedenen Stämme dargestellt. Nach 24 h erreichte der Wildtyp einen cfu-Wert von ca. 5×10^5 /ml. Die replikationsgeschwächten Mutanten $dotA^-$ und Δmip hatten dagegen nur einen cfu-Wert von ca. 9×10^3 /ml. Die *lpC_2560*-Deletionsmutante erreichte nach 24 h nur eine cfu von 2×10^3 /ml. Nach 48 h replizierte sich der Wildtyp auf einen cfu-Wert von ca. 4×10^7 /ml, was im Vergleich zum 24 h-Wert eine 80-fache Vermehrung darstellte. Der cfu-Wert der DotA-Mutante verringerte sich nach 48 h auf 1×10^3 /ml und die Mip-Mutante vermehrte sich leicht auf einen cfu-

Wert von 4×10^5 / ml. Die *lpC_2560*-Deletionsmutante hatte auch nach 48 h nur einen cfu-Wert von 1×10^5 / ml. Insgesamt stellte sich heraus, dass die *lpC_2560*-Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp eine verminderte intrazelluläre Replikation aufwies, die in etwa mit der *mip*-Deletionsmutante vergleichbar war.

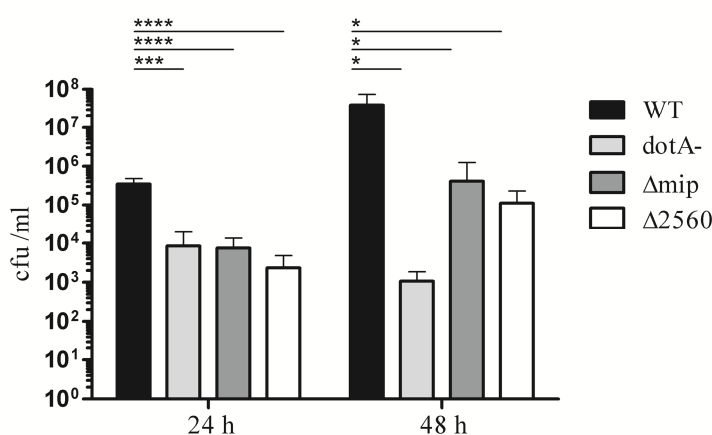


Abbildung 43: Infektion von THP-1-Makrophagen mit Legionellen. THP-1-Makrophagen wurden mit dem LpC Wildtyp, *dotA*⁻, *Δmip* und *Δ2560* infiziert. Die Ansätze wurden nach 24 h und 48 h ausplattiert und die cfu-Werte bestimmt. Die Signifikanz wurde mit einem einseitigen Student's *t*-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 % errechnet (**p* ≤ 0,05; ***p* ≤ 0,01; ****p* ≤ 0,001; *****p* ≤ 0,0001). Die *lpC_2560*-Deletionsmutante zeigte eine verringerte intrazelluläre Replikation in Makrophagen.

Parallel wurden auch die THP-1-Makrophagen mit den bereits beschriebenen Komplementationsstämmen infiziert. Die Ergebnisse der Infektion sind in Abbildung 44 dargestellt. Nach 24 h hatte sich WT (+) auf einen cfu-Wert von 3×10^3 / ml vermehrt, die Mip-Komplementante wies eine cfu von 2×10^3 / ml auf und die LpC_2560-Komplementante eine cfu von $1,5 \times 10^3$ / ml. WT (+) und Mip (+) zeigten nach 24 h keinen signifikanten Unterschied, WT (+) und 2560 (+) interessanterweise schon (**p* ≤ 0,05). Nach 48 h hatte die LpC_2560-Komplementante mit ca. 2×10^3 cfu/ ml jedoch keine signifikant geringere Zellzahl als WT (+) und Mip (+) mit ca. 5×10^3 cfu/ ml und 3×10^3 cfu/ ml. Obwohl keine vollständige Komplementation nach 24 h erreicht werden konnte, wurde eine deutliche Verbesserung der Vermehrung der LpC_2560-Komplementante im Vergleich zu *Δ2560* beobachtet und der Unterschied zum Wildtyp war deutlich weniger signifikant, als bei der Infektion mit den Deletionsmutanten. Wird

die absolute Zellzahl des Wildtyps mit der der *lpC_2560*-Deletionsmutante verglichen, fallen innerhalb des Infektionsverlaufs Unterschiede von bis zu zwei log-Stufen auf. Diese sind zwischen WT (+) und 2560 (+) jedoch wesentlich geringer. Insgesamt betrachtet wurde also eine erfolgreiche Komplementation erzielt.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass LpC_2560 wichtig für die intrazelluläre Replikation in THP-1-Makrophagen ist.

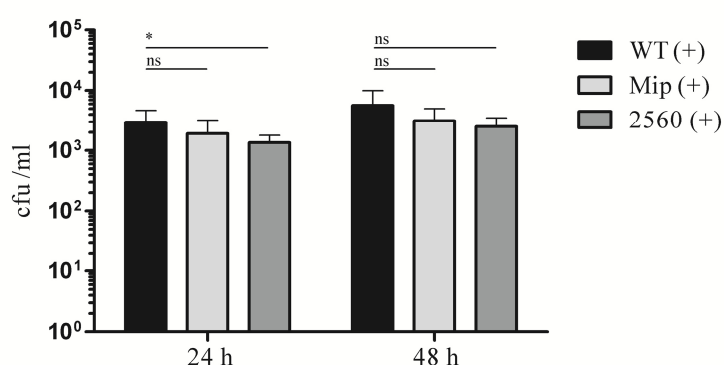


Abbildung 44: Infektion von THP-1-Makrophagen mit *Legionella*-Komplementanten. THP-1-Makrophagen wurde mit dem LpC Wildtyp (+), Mip (+) und 2560 (+) infiziert. Die Ansätze wurden nach 24 h und 48 h ausplattiert und die cfu-Werte bestimmt. Die Signifikanz wurde mit einem einseitigen Student's *t*-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 % errechnet (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$). Die LpC_2560-Komplementante unterschied sich in der Zellzahl kaum von LpC Wildtyp (+) und Mip (+).

5.4.6.3 LpC_2560 beeinflusst die intrazelluläre Replikation in HLTEs

Bei den vorangegangenen Infektionsexperimenten wurde beobachtet, dass LpC_2560 als neuer Virulenzfaktor eine verringerte Replikation in *A. castellanii* und THP-1-Makrophagen zur Folge hatte. Um zu testen, wie sich die *lpC_2560*-Deletionsmutante in humanem Lungengewebe verhält, wurde der Infektionsverlauf im Zellverband der HLTEs analysiert. Auch hier wurden der Wildtyp und die replikationsgeschwächten Stämme *dotA*⁻ und Δ *mip* als Kontrollstämme verwendet. Kleine Stückchen des explantierten, humanen Lungengewebes wurden in Legionellensuspension überführt. Nach 2 h, 24 h und 48 h wurde das HLTE-Stück gewogen, homogenisiert und die

Anzahl der intrazellulären Bakterien durch Ausplattieren auf BCYE-Agar bestimmt. In Abbildung 45 ist die intrazelluläre Replikation der verschiedenen Stämme dargestellt. Der Wildtyp vermehrte sich über die Zeitpunkte konstant. Nach zwei Stunden wurde eine Zellzahl von 4×10^6 cfu/ g Gewebe ermittelt, nach 24 h stieg diese signifikant auf 2×10^7 cfu/ g Gewebe und nach 48 h signifikant auf 7×10^7 cfu/ g Gewebe. Der Stamm *dotA*⁻ vermehrte sich vom 2 h-Wert 6×10^6 cfu/ g Gewebe nach 24 h leicht auf 8×10^6 cfu/ g Gewebe und nach 48 h auf ca. $1,3 \times 10^7$ cfu/ g Gewebe. Die Vermehrung der DotA-Mutante war insgesamt nicht signifikant.

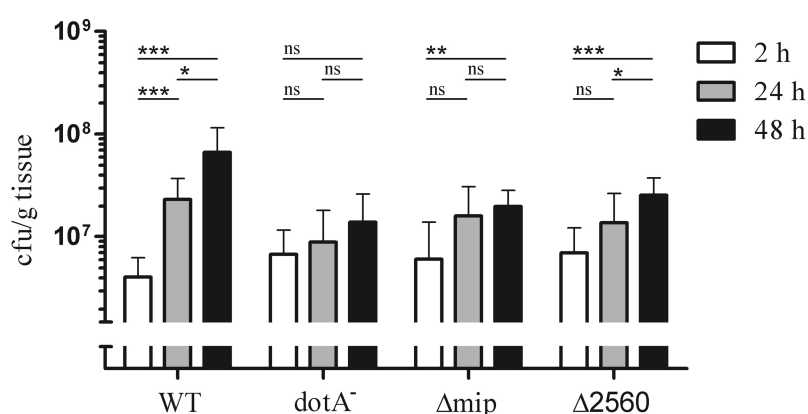


Abbildung 45: Infektion von HLTEs mit Legionellen. HLTEs wurden mit dem LpC Wildtyp, *dotA*⁻, Δmip und $\Delta 2560$ infiziert (n=5). Die Ansätze wurden nach 2 h, 24 h und 48 h homogenisiert, ausplattiert und die cfu-Werte bestimmt. Die Signifikanz wurde mit einem einseitigen Student's *t*-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 % errechnet (**p* ≤ 0,05; ***p* ≤ 0,01; ****p* ≤ 0,001). *lpC_2560*-Deletionsmutante zeigte eine verminderte intrazelluläre Replikation in HLTEs.

Die *mip*-Deletionsmutante multiplizierte sich zwischen 2 h und 24 h nicht signifikant 2,5-fach auf ca. $1,5 \times 10^7$ cfu/ g Gewebe. Zwischen 24 h auf 48 h stieg der cfu-Wert nicht signifikant weiter auf 2×10^7 / g Gewebe. Die gesamte Vermehrung der *mip*-Deletionsmutante zwischen 2 h und 24 h war jedoch signifikant (***p* ≤ 0,01). Beide Kontrollstämme hatten im Vergleich zum Wildtyp eine verminderte intrazelluläre Replikation. Die Vermehrung der *lpC_2560*-Deletionsmutante glich insgesamt den Kontrollstämmen. Nach 2 h wurde ein cfu-Wert von 7×10^6 / g Gewebe ermittelt. Nach 24 h stieg die Zellzahl nicht signifikant auf ca. $1,5 \times 10^7$ cfu/ g Gewebe und nach 48 h signifikant 2-fach auf 3×10^7 cfu/ g Gewebe (**p* ≤ 0,05). Die gesamte Vermehrung zwischen 2 h und 48 h war ebenfalls signifikant (***)*p* ≤ 0,001).

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass die *lpC_2560*-Deletionsmutante sich schlechter in humanem Lungengewebe vermehren kann. *LpC_2560* spielt also ebenso wie *Mip* eine Rolle bei der intrazellulären Replikation.

5.4.6.4 Die Isolation von rekombinantem *LpC_2560*

Das *Mip*-abhängig sezernierte Protein *LpC_2560* konnte bisher als neuer Virulenzfaktor von *L. pneumophila* identifiziert werden, der wichtig für die Replikation in *A. castellanii*, THP-1-Makrophagen und HLTEs ist. Um dieses bis dato unerforschte Protein weiter charakterisieren zu können, sollte es rekombinant produziert und isoliert werden. Mit dem rekombinanten Protein sollten u.a. Bindungsstudien mit dem *Mip*-Protein durchgeführt werden. Zu Beginn wurde die Proteinsequenz in das Programm Expasy (http://web.expasy.org/cgi-bin/compute_pi/pi_tool) eingegeben. Daraus ergab sich ein vorhergesagtes Molekulargewicht von 23,35 kDa und ein pI von 5,76. Für die rekombinante Produktion wurden verschiedene Systeme ausprobiert. Zunächst wurde das Gen *LpC_2560* so amplifiziert, dass durch den eingesetzten Primer (2560_fw und 2560_rev) ein Hexahistidin-Tag am 3'-Ende angehängt wurde. Das Amplifikat und der Vektor pBCKS (+) wurden anschließend mit *SacI* und *KpnI* geschnitten. Nach der Ligation wurde das Vektor-Konstrukt in *E. coli* DH10 β gebracht. Nach Verifikation eines intakten Produktionsstammes via PCR wurde dieser kultiviert, induziert und die Bakterien geerntet. Das Zellpellet wurde via French-Press aufgeschlossen und das Protein über eine Nickel-Chelat-Chromatographie aufgereinigt. Die Elution des Proteins erfolgte mit Imidazol. In Abbildung 46 ist das Ergebnis der Aufreinigung zu sehen. Ab Elutionsfraktion 3 (10 mM Imidazol) waren intensive Banden eines Proteins zu beobachten, das knapp unter 25 kDa läuft. Von der Größe her entsprach das *LpC_2560*. Ein Western Blot dieses Gels, angefärbt mit einem anti-Hexahistidin-Antikörper, verifizierte dieses Protein zudem als *LpC_2560* (Daten nicht gezeigt). Leider wurden bei der Elution gleichzeitig auch viele andere Proteine freigesetzt, sodass mit dieser Methode kein reines *LpC_2560* aufgereinigt werden konnte. Die Aufreinigung mit Hilfe eines Hexahistidin-Tags war somit nicht erfolgreich.

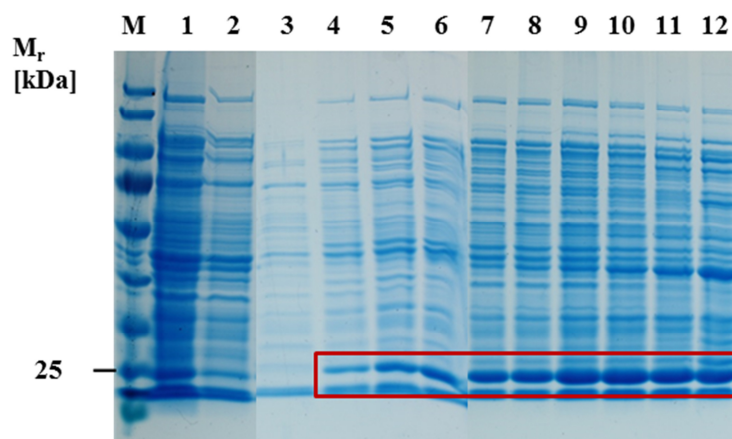


Abbildung 46: SDS-PAGE der Aufreinigung des rekombinanten LpC_2560_His. Eine induzierte Kultur des Produktionsstammes wurde geerntet und nach Zellaufschluss mit Hilfe einer FrenchPress wurde das Protein über eine Nickel-Chelat-Chromatographie aufgereinigt. M: Page Ruler Prestained Protein Ladder #SM0672 1: Durchfluss 2: Waschfraktion 3-4: Elutionsfraktion 1-2 mit 5 mM Imidazol 5-6: Elutionsfraktion 3-4 mit 10 mM Imidazol 7-8: Elutionsfraktion 5-6 mit 15 mM Imidazol 9-10: Elutionsfraktion 7-8 mit 20 mM Imidazol 11-12: Elutionsfraktion 9-10 mit 50 mM Imidazol. Das rekombinante Protein LpC_2560_His (rot) konnte nicht in reiner Form aufgereinigt werden.

Als nächste Methode wurde eine Aufreinigung über Streptavidin-Tag ausprobiert. Dafür wurde das Gen *LpC_2560* mit den Primern 2560_F2 und 2560_R2 amplifiziert. Das Amplifikat und der Vektor pET52b (+) wurden anschließend mit *SacI* und *SmaI* geschnitten. Der Vektor pET52b (+) enthielt einen C-terminalen Streptavidin-Tag. Nach der Ligation wurde das Vektor-Konstrukt zunächst in *E. coli* DH10 β gebracht und nach der Reisolation in den Produktionsstamm *E. coli* BL21. Nach Verifikation eines intakten Produktionsstammes via PCR wurde dieser kultiviert, induziert und die Bakterien wurden geerntet. Das Zellpellet wurde via French-Press aufgeschlossen und das Protein über eine Strep-Tactin Säule (Iba) aufgereinigt und mit Biotin eluiert. In Abbildung 47 ist das Ergebnis der Aufreinigung zu sehen. Das rekombinante LpC_2560 wurde in großen Mengen produziert, lief aber schon ohne zu binden mit dem Durchfluss durch die Säule. Ein Western Blot der SDS-PAGE, gefärbt mit einem anti-Streptavidin Antikörper, verifizierte das Protein. LpC_2560 konnte nicht an die Säule binden, da es bereits während der Produktion in *E. coli* BL21 in Inklusionskörpern eingeschlossen wurde. Weder die Änderung der Produktionsbedingungen, wie z.B. Medien- oder Temperaturwechsel, noch die Rückfaltung des Proteins aus den Inklusionskörpern

waren erfolgreich. Die Methode der rekombinanten Aufreinigung mit C-terminalen Streptavidin-Tag hat somit auch nicht funktioniert.

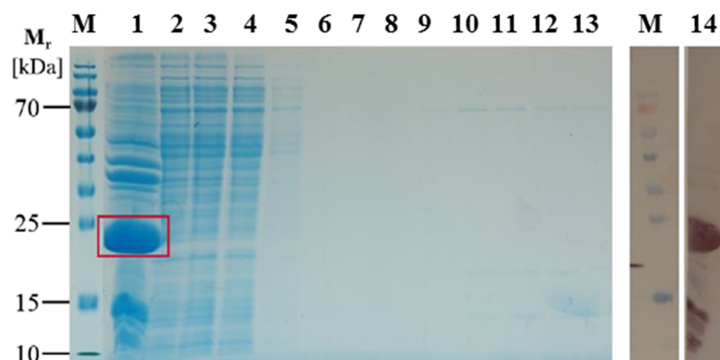


Abbildung 47: SDS-PAGE und Western Blot der Aufreinigung des rekombinanten LpC_2560_Strep. Eine induzierte Kultur des Produktionsstammes wurde geerntet und nach Zellaufschluss wurde das Protein über eine Strep-Tactin-Säule aufgereinigt. M: Page Ruler Prestained Protein Ladder #SM0672 1: Pellet 2: Überstand 3: Durchfluss 4-7: Waschfraktionen 1, 2, 4 und 5 8-13: Elutionsfraktion 1-6 14: Western Blot der Pelletfraktion, angefärbt mit anti-Streptavidin Antikörper. Das rekombinante Protein LpC_2560_Strep (rot) endete in Inklusionskörpern.

Als dritte Methode wurde die Aufreinigung mit Hilfe eines Tags bestehend aus einem Hexahistidin-Tag und einem Maltose-bindenden-Proteins (MBP) ausprobiert. Das MBP hat ein Molekulargewicht von 42,5 kDa und ist ein Fusionsprotein, was die Löslichkeit eines produzierten Proteins verbessern kann. Dafür wurde das Gen *LpC_2560* mit den Primern 2560_F1 und 2560_R1_3 amplifiziert. Das Amplifikat und der Vektor pMAL3723 wurden mit *NdeI* und *XhoI* geschnitten und anschließend zu einem Produktionsplasmid ligiert. Dieses wurde zunächst in *E. coli* DH10 β und nach der Reisolation in den Produktionsstamm *E. coli* BL21 gebracht. Nach Verifikation eines intakten Produktionsstammes via PCR wurde dieser kultiviert, induziert und die Bakterien wurden geerntet. Das Zellpellet wurde via French-Press aufgeschlossen und das Protein über das Ni-TED 2000 Kit (Macherey & Nagel) aufgereinigt. Die Ergebnisse der Aufreinigung sind in Abbildung 48 zu sehen. Das Fusionsprotein, bestehend aus MBP (42,5 kDa) und LpC_2560 (23,4 kDa), sollte ein Molekulargewicht von 65,9 kDa haben. In den Elutionsfraktionen 1-3 sind vorrangig zwei Proteine

enthalten. Eins hatte die Größe von ca. 66 kDa (rot) und das Zweite eine Größe von ca. 42 kDa (grün). Durch den Nachweis des am Fusionsprotein vorhandenen Hexahistidintags via Westernblot, konnte das 66 kDa-Protein als Fusionsprotein identifiziert werden. Bei dem Protein mit der Größe von ca. 42 kDa handelte es sich vermutlich um das einzelne MBP. Auf der Höhe von LpC_2560 war nur eine sehr leichte Bande zu erkennen. Die Elutionsfraktionen 1-3 wurden anschließend zusammengeführt und über Nacht mit der TEV-Protease dialysiert, um zum einen eine Umpufferung vorzunehmen und zum anderen das MBP von LpC_2560 abzuspalten. Danach wurde die Proteinlösung erneut über eine Säule des Ni-TED 2000 Kits gegeben. Das nun einzeln vorliegende MBP sollte aufgrund seines Hexahistidin-Tags an der Säule binden und das reine LpC_2560 im Durchfluss verbleiben. Interessanterweise band an der Säule das ungeschnittene Fusionsprotein (65,9 kDa) und im Durchfluss befand sich eine Mischung aus Fusionsprotein und einzelem MBP.

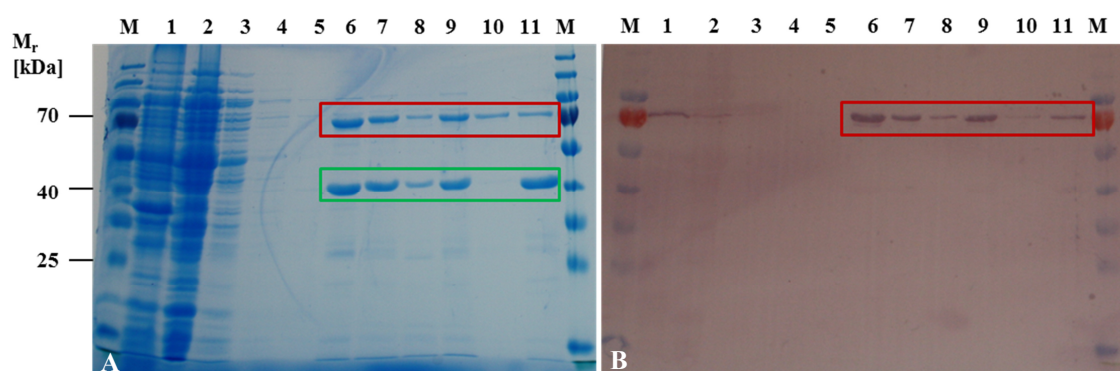


Abbildung 48: SDS-PAGE (A) und Western Blot (B) der Aufreinigung des rekombinanten LpC_2560-MBP. Eine induzierte Kultur des Produktionsstammes wurde geerntet und nach Zellaufschluss wurde das Protein über eine Ni-TED-Säule aufgereinigt. M: Page Ruler Prestained Protein Ladder #SM0672 1: Pellet 2: Durchfluss 3-5: Waschfraktionen 1-3 6-8: Elutionsfraktion 1-3 9: Zusammengeführte Elutionsfraktionen nach Dialyse und TEV-Verdau 10: Durchfluss nach erneuter Säulenchromatografie von Elutionsfraktionen nach Dialyse und TEV-Verdau (reines LpC_2560). Im Gel sind die Fusion aus MBP und LpC_2560 (rot) und reines MBP (grün) zu sehen. Das rekombinante Protein LpC_2560_Strep konnte nicht vom MBP abgespalten werden.

Die Spaltung durch die TEV-Protease war also nicht erfolgreich und auch die Menge des rekombinanten Proteins ist sehr gering. Optimierungen bei der Behandlung des

Fusionsproteins mit der TEV-Protease brachten auch keinen Erfolg. Diese Methode eignete sich also auch nicht für die rekombinante Produktion von LpC_2560.

Zusätzlich wurden auch die Vektorsysteme pET19_3190 (Vektor ohne Löslichkeitsprotein) und pET19_3685 (Vektor mit SidC als Löslichkeitsprotein) in *E.coli* BL21 getestet, aber bei diesen Systemen wurde LpC_2560 gar nicht produziert (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend wird klar, dass keine der verwendeten Methoden für die Produktion und Aufreinigung von rekombinantem LpC_2560 geeignet ist.

5.5 Analyse der Interaktion zwischen den PPIasen Mip und PpiB in Bezug auf Virulenz und Physiologie

In *L. pneumophila* wurden insgesamt sechs PPIasen annotiert. Die bisher meist charakterisierten sind das FKBP Mip und das Cyclophilin PpiB (Rasch *et al.*, 2014). Da die Bedeutung der PPIase-Aktivität allgemein für *L. pneumophila* weitestgehend unbekannt ist, sollte sie im Rahmen dieser Arbeit analysiert werden. Dabei wurde auch die Fragestellung nach einer möglichen Interaktion zwischen Mip und PpiB in Bezug auf Virulenz und Physiologie untersucht.

5.5.1 Herstellung der *ppiB*-Deletionsmutante und einer $\Delta mip \Delta ppiB$ -Doppelmutante

Um die PPIase PpiB näher charakterisieren zu können, wurde in Zusammenarbeit mit Natascha Heinsohn (Heinsohn, 2013) eine Deletionsmutante in *L. pneumophila* Corby hergestellt. Dafür wurden die 5' und 3' flankierenden Regionen (1264 bp und 1409 bp) mit Überhängen amplifiziert (Primer: PpiB_UFF und PpiB_UFR_Kan für 5'-Flanke, PpiB_DFF_Kan und PpiB_DFR für 3'-Flanke) und zusammen mit einer Kanamycin-Kassette durch eine Joining-PCR (Primer: PpiB_UFF und PpiB_DFR) zu einem Deletions-Konstrukt mit einer Größe von 3489 bp verbunden. In Abbildung 49 sind die Agarose-Gelfotos der Konstrukte zu sehen. Das Produkt der 5'-flankierenden Sequenz (Abb. 49 A) hatte eine Größe von ca. 1300 bp. Die Größe stimmte mit der im Vorfeld ermittelten Konstruktlänge von 1264 bp überein. Auch die Größe der 3'-Flanke von ca.

1400 bp (Abb. 49 B), passte zu den vorhergesagten 1409 bp. Beide Amplifikate wurden anschließend durch eine Joining-PCR mit einer Kanamycin-Kassette (*npt I* = 816 bp) zusammengefügt. Das Fusionsprodukt hatte eine Größe von ca. 3,5 kb, was zu ermittelten Länge von 3489 bp passte. Anschließend wurde dieses Konstrukt in einen pGEMT-easy Vektor kloniert und in kompetente *E.coli* DH10 β gebracht. Ein intaktes Plasmid wurde als Template für die erneute Amplifikation des Joining-Konstrukts verwendet. Das Amplifikat wurde zu Legionellen in der exponentiellen Wachstumsphase zugefügt. Die DNA wurde mit Hilfe der natürlichen Kompetenz in die Legionellen aufgenommen, sodass das GOI durch homologe Rekombination ersetzt werden konnte. Schlussendlich wurde eine *L. pneumophila* Corby *ppiB*-Mutante durch PCR und Sequenzierung verifiziert und für weitere Studien verwendet.

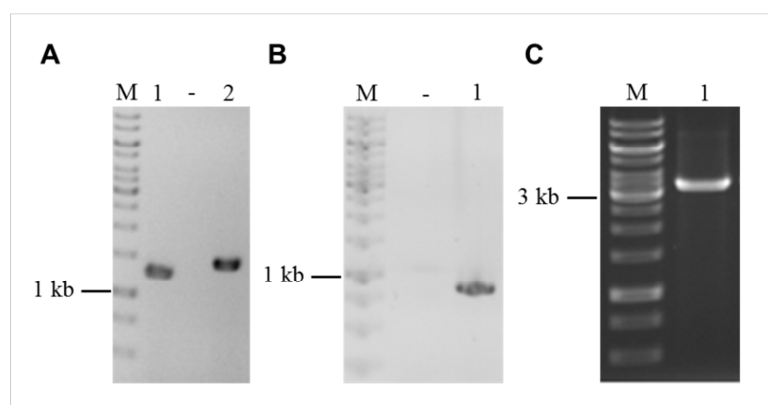


Abbildung 49: Amplifikation der Deletions-Konstrukte mit Hilfe von PCR. Dargestellt ist ein 1 %-iges Agarosegel nach Ethidiumbromidfärbung. Als Marker wurde die 1 kb GeneRuler® DNA-Ladder von Thermo Scientific verwendet. (A) 1: Amplifikation der 1264 bp großen 5'-Flanke von *ppiB*. (-): Negativkontrolle. 2: Amplifikation der 1409 bp großen 3'-Flanke von *ppiB*. (B) 1: Amplifikation der 618 bp großen Kanamycin-Kassette. (-): Negativkontrolle. (C) 1: Zusammengefügtes Produkt aus 5'-Flanke (1264 bp), Kanamycin-Kassette (816 bp) und 3'-Flanke (1409 bp) mit einer Gesamtgröße von 3489 bp.

Um die Interaktion zwischen den PPIasen Mip und PpiB in Bezug auf Virulenz und Physiologie charakterisieren zu können, wurde zusätzlich eine $\Delta mip \Delta ppiB$ -Doppelmutante in *L. pneumophila* Corby Δmip hergestellt. Dafür wurden die 5' und 3' flankierenden Regionen (1264 bp und 1409 bp) mit Überhängen amplifiziert (Primer:

PpiB_UFF und PpiB_UFR_Cm für 5'-Flanke, PpiB_DFF_Cm und PpiB_DFR für 3'-Flanke). Die Überhänge wurden mit Hilfe einer Joining-PCR (Primer: PpiB_UFF und PpiB_DFR) amplifiziert. In Abbildung 50 sind die Agarose-Gelfotos der einzelnen Konstrukte zu sehen. Das Produkt der 5'-flankierenden Sequenz (Abb. 50 A) mit der Größe von ca. 1300 bp und die 3'-Flanke mit der Größe von ca. 1400 bp (Abb. 50 B) passten zu den vorhergesagten Größen. Die beiden Amplifikate wurden mittels Joining-PCR mit einer Chloramphenicol-Kassette (*cat* = 660 bp) verbunden. Das Fusionsprodukt sollte insgesamt 3333 bp lang sein und wies im Agarosegel eine Größe von ca. 3300 bp auf. Anschließend wurde dieses Konstrukt in einen pGEMT-easy Vektor kloniert, in kompetente *E.coli* DH10 β gebracht und nach der Reisolation als Template für die erneute Amplifikation des Joining-Konstrukts verwendet.

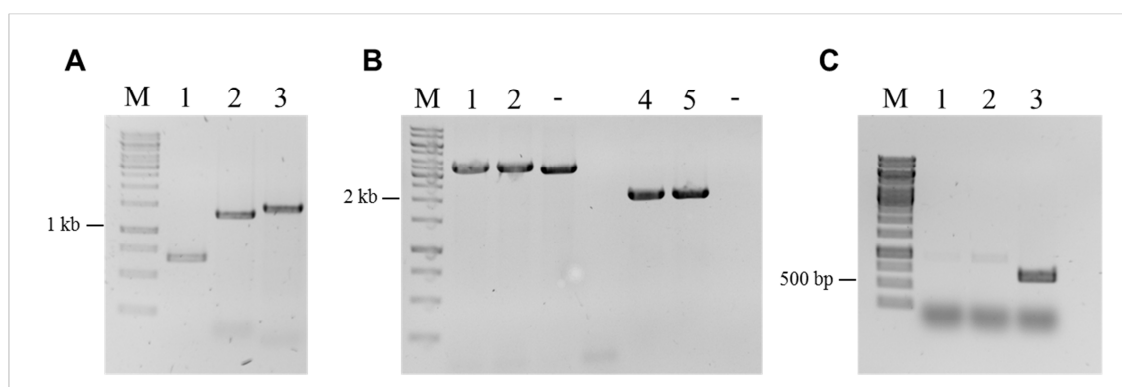


Abbildung 50: Amplifikation der Deletions-Konstrukte mit Hilfe von PCR. Dargestellt ist ein 1 %-iges Agarosegel nach Ethidiumbromidfärbung. Als Marker wurde die 1 kb GeneRuler® DNA-Ladder von Thermo Scientific verwendet. (A) 1: Amplifikation der Chloramphenicol-Kassette 2: Amplifikation der 1264 bp großen 5'-Flanke von *ppiB*. 3: Amplifikation der 1409 bp großen 3'-Flanke von *ppiB*. (B) Überprüfung der Klone 1 und 2: Amplifikation des Deletionskonstrukts bestehend aus 5'-Flanke (1264 bp), Chloramphenicol-Kassette (660 bp) und 3'-Flanke (1409 bp) mit einer Gesamtgröße von 3333 bp mit den Primern PpiB_UFF_seq und PpiB_DFR_seq. 4-5: Amplifikation des Deletionskonstrukts mit den Primern PpiB_UFF_seq und Cm_R (-): Genomische DNA von LpC als Kontrolle (C) Amplifikation des Mip-Gens mit Mip_fw und Mip_rev (699 bp). 1: Klon 1. 2: Klon 2. 3: Genomische DNA von LpC als Kontrolle.

Das Amplifikat wurde zu dem Stamm *L. pneumophila* Corby Δ mip in der exponentiellen Wachstumsphase gegeben, damit die DNA mit Hilfe der natürlichen

Kompetenz in die Legionellen aufgenommen und das GOI durch homologe Rekombination ersetzt werden konnte. Das eingebrachte Deletionskonstrukt wurde mit den Primern PpiB_UFF_seq und PpiB_DFR_seq amplifiziert (Abb. 50 B), um die korrekte Lokalisation zu bestätigen. Der Primer PpiB_UFF_seq bindet 135 bp weiter stromaufwärts als PpiB_UFF und PpiB_DFR_seq 116 bp weiter stromabwärts als PpiB_DFR. Damit ergab sich eine errechnete Gesamtlänge des Amplifikats von 3584 bp. Als Kontrolle wurde die genomische DNA von *L. pneumophila* Corby (LpC) verwendet. Die Amplifikate der Klone hatten eine Größe von ca. 3,5 kb was der vorausgesagten Größe von 3584 bp entsprach. Das Amplifikat der genomischen DNA war wie erwartet etwas kleiner, da das dort vorhandene *ppiB*-Gen mit einer Länge von 495 bp insgesamt 165 bp kleiner ist als die Chloramphenicol-Resistenzkassette in der Mutante. Gleichzeitig wurden die beiden Klone mit den Primern PpiB_UFF_seq und Cm_rev überprüft. In diesem Fall war eine Konstruktgröße von 2059 bp zu erwarten, welche die Amplifikate der Klone aufwiesen. Bei dem Ansatz mit der genomischen DNA war keine Bande zu sehen, da der Cm_rev-Primer hier nicht binden konnte. Insgesamt wurde gezeigt, dass in den Klonen die ausgewählte Region des *ppiB*-Gens an der richtigen Stelle durch das Deletionskonstrukt ersetzt wurde. Um zusätzlich sicherzugehen, dass in der Doppelmutante kein *mip*-Gen vorliegt, wurde eine PCR mit Mip-spezifischen Primern durchgeführt (Abb. 50 C). In beiden Klonen war keine Mip-spezifische Bande zu erkennen, bei der Kontrolle aber schon. Schlussendlich konnte erfolgreich eine $\Delta mip \Delta ppiB$ -Deletionsmutante generiert werden.

5.5.1.1 Komplementation der *ppiB*-Deletionsmutante

Um verifizieren zu können, dass beobachtete Phänotypen der *ppiB*-Deletionsmutante auf das Protein PpiB zurückzuführen sind und nicht auf etwaige Sekundäreffekte oder Rekombinationsfehler, wurde eine Komplementante erstellt. Dafür wurde das 495 bp lange *ppiB*-Gen mittels PCR amplifiziert. Analog zum Komplementationskonstrukt von LpC_2560 (Kapitel 5.5.6) wurde der Forward-Primer PpiB_F1 so entworfen, dass er 211 bp vor dem Startcodon des GOI bindet, da so der natürliche Promotor ebenfalls vorhanden ist. Als reverser Primer wurde PpiB_R1 verwendet. Das amplifizierte Gen (706 bp) wurde in einen pBCKS(+)-Vektor kloniert und das Komplementations-

Konstrukt per Elektroporation in die *ppiB*-Deletionsmutante eingebracht. Die Komplementante wurde mit Hilfe von PCR (Abb. 51) und Sequenzierung verifiziert. Im Komplementationsstamm war das Gen *ppiB* inklusive Promotor-Bereich (706 bp) wieder nachweisbar.

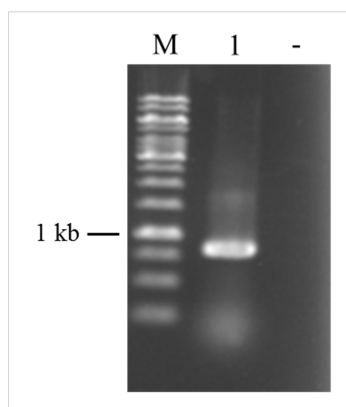


Abbildung 51: Amplifikation des Komplementations-Konstrukts mit Hilfe von PCR. Dargestellt ist ein 1 %-iges Agarosegel nach Ethidiumbromidfärbung. Als Marker wurde die 1 kb GeneRuler® DNA-Ladder von Thermo Scientific verwendet. 1: Amplifikation des *ppiB*-Konstrukts (706 bp) in *L. pneumophila* Corby PpiB (+) zur Verifikation der Komplementante (-) Negativkontrolle Wasser.

5.5.2 Mip und PpiB sind wichtig für das Wachstum von *L. pneumophila* bei extremen Temperaturen

Für die PPIase PpiB wurde bereits publiziert, dass diese eine Rolle beim Wachstum von *L. pneumophila* bei niedrigen Temperaturen spielt (Söderberg und Cianciotto, 2008). Um herauszufinden, ob dieser Effekt auf die PPIase-Funktion zurückzuführen ist, wurde auch die Mip-Mutante auf ihr Wachstum bei 17 °C überprüft. Des Weiteren wurde die Doppelmutante in diesem Assay eingesetzt, um zu analysieren, ob es eine Interaktion im Sinne einer Kompensation zwischen den PPIasen Mip und PpiB beim Temperaturwachstum gibt. Würde dies zutreffen, müsste die Doppelmutante einen stärkeren Wachstumsdefekt zeigen als die Einzelmutante. Als Kontrolle diente der Wildtyp. Zusätzlich wurden alle Stämme auch auf das Wachstum bei hohen Temperaturen getestet (42 °C und 44°C). Die Versuche wurden teilweise in

Zusammenarbeit mit Natascha Heinsohn und Alina Klages durchgeführt (Heinsohn, 2013; Klages, 2015). Für die Durchführung wurde die Zellzahl einer stationären Vorkultur auf 1×10^8 cfu/ ml (für niedrige Temperaturen) oder auf 1×10^9 cfu/ ml (für hohe Temperaturen) eingestellt. Aus diesem Ansatz wurde eine Verdünnungsreihe in 10-fach-Schritten hergestellt. Für jeden Stamm wurde die Verdünnungsreihe auf eine einzelne BCYE-Agarplatte getropft und trocknen gelassen. Die Platten wurden bei 17 °C, 37°C, 42 °C und 44°C inkubiert. In Abbildung 52 A ist das Wachstum bei 37 °C dokumentiert. Keine der Mutanten hatte ein Wachstumsdefizit gegenüber dem Wildtyp. Alle Stämme wuchsen bis zu der größten ausplattierten Verdünnung von 1×10^{-6} . Bei 17 °C (Abb. 52 B) vermehrte sich der Wildtyp bis zu einer Verdünnung von 1×10^{-5} . Dagegen zeigten $\Delta ppiB$ und $\Delta mip\Delta ppiB$ nur ein Wachstum bis 1×10^{-3} und Δmip bis 1×10^{-4} . Die Doppelmutante wuchs aber bei allen Verdünnungsstufen nur sehr leicht an. Beide PPIase-Mutanten konnten sich bei 17 °C schlechter vermehren als der Wildtyp. Die Doppelmutante wuchs insgesamt schlechter als die Mip-Mutante und auch verzögert im Vergleich zur PpiB-Mutante.

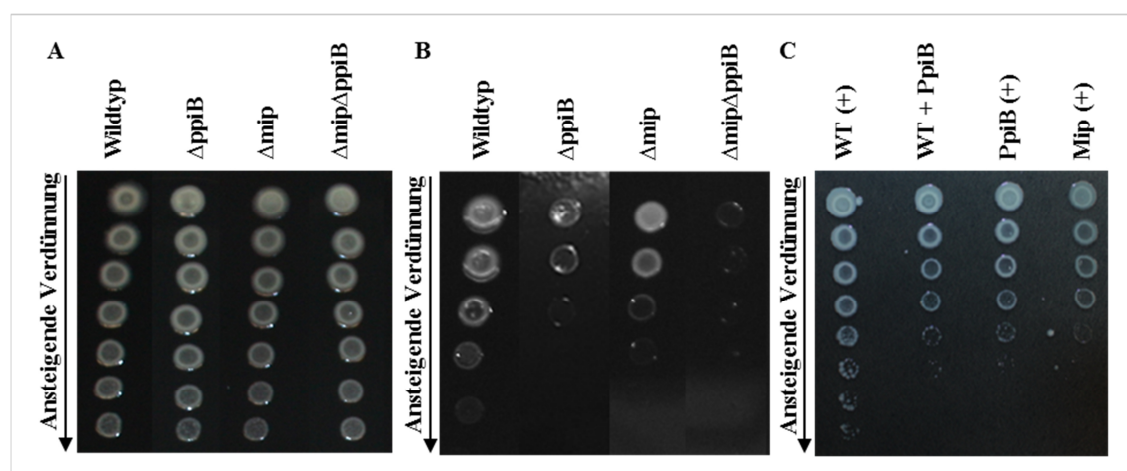


Abbildung 52: Wachstum von *Legionella*-Stämmen bei niedrigen Temperaturen. (A) Analyse des Wachstums von LpC Wildtyp, Δmip , $\Delta ppiB$ und $\Delta mip\Delta ppiB$ bei 37 °C. Die Deletionsmutanten hatten im Vergleich zum WT keinen Wachstumsnachteil. (B) Analyse des Wachstums von LpC Wildtyp, Δmip , $\Delta ppiB$ und $\Delta mip\Delta ppiB$ bei 17 °C. Die PPIase-Mutanten konnten schlechter vermehren. Die Doppelmutante zeigte ein verschlechtertes Wachstum gegenüber Δmip und $\Delta ppiB$. (C) Analyse des Wachstums von LpC Wildtyp (+), Mip (+) und PpiB (+) bei 17 °C. Durch die Komplementation wurde das Wachstum der Deletionsmutanten verbessert.

Für die Bestätigung der Ergebnisse wurde das Wachstum der Komplementanten bei 17 °C verglichen (Abb. 52 C). Durch die Komplementation von *mip*- und *ppiB*-Deletionsmutanten auf Proteinebene konnte das Wachstum um eine log-Stufe verbessert

werden. Die Komplementanten der Deletionsmutanten wuchsen nun bis zu einer Verdünnung von 1×10^{-5} . Durch diese Komplementationsmethode konnte das Wildtyp (+)-Niveau jedoch nicht vollständig wiederhergestellt werden. Eine Überproduktion von PpiB im Wildtyp führte zu keiner Verbesserung des Wachstums bei 17 °C.

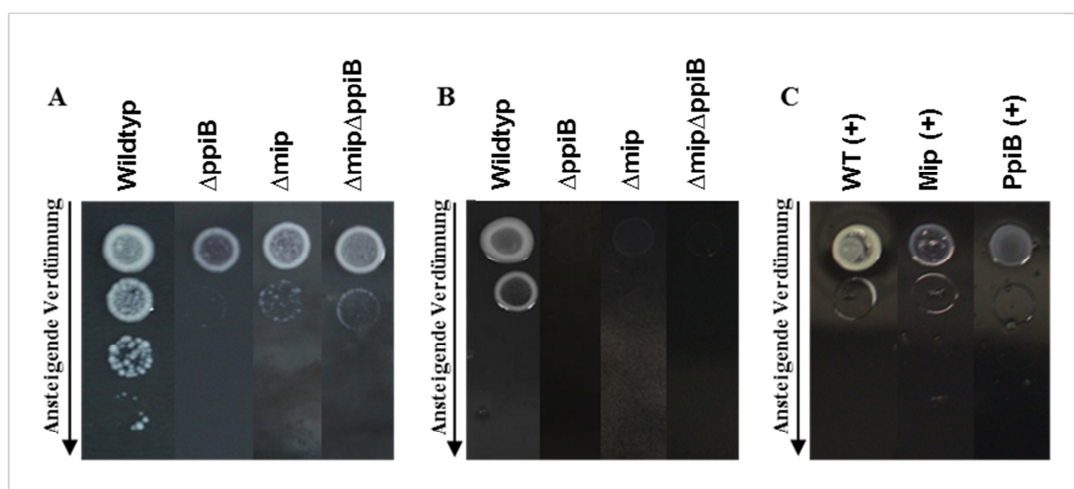


Abbildung 53: Wachstum von *Legionella*-Stämmen bei hohen Temperaturen. (A) Analyse des Wachstums von LpC Wildtyp, Δmip , $\Delta ppiB$ und $\Delta mip\Delta ppiB$ bei 42 °C. Die Deletionsmutanten haben im Vergleich zum WT einen Wachstumsnachteil. (B) Analyse des Wachstums von LpC Wildtyp, Δmip , $\Delta ppiB$ und $\Delta mip\Delta ppiB$ bei 44 °C. Die PPIase-Mutanten und die Doppelmutante konnten sich schlechter vermehren. (C) Analyse des Wachstums von LpC Wildtyp (+), Mip (+) und PpiB (+) bei 44 °C. Das Wachstumsverhalten der Deletionsmutanten erreichte durch die Komplementation wieder das Wildtyp-Level.

In Abbildung 54 ist das Wachstum der Stämme bei 42 °C und 44 °C dargestellt. Bei 42 °C (Abb. 53 A) wuchs der Wildtyp bis zu einer Verdünnung von 1×10^{-3} . Dagegen zeigten $\Delta ppiB$, Δmip und $\Delta mip\Delta ppiB$ nur ein Wachstum bis 1×10^{-1} . Beide PPIase-Mutanten und die Doppelmutante vermehrten sich bei 42 °C zwei log-Stufen schlechter als der Wildtyp. Bei 44 °C war Ähnliches zu beobachten (Abb. 53 B). Der Wildtyp vermehrte sich bei dieser Temperatur bis zu einer Verdünnung von 1×10^{-1} . Alle Mutanten zeigten jedoch nur ein sehr geringfügiges Wachstum beim unverdünnten Ansatz. Insgesamt lag auch bei 44 °C ein großes Wachstumsdefizit bei den PPIase-Mutanten vor. Für die Bestätigung der Ergebnisse wurde das Wachstum der Komplementanten bei 44 °C verglichen (Abb. 53 C). Durch die Komplementation der *mip*- und *ppiB*-Deletionsmutanten auf Proteinebene konnte das Wachstum wieder auf Wildtyp-Level angehoben werden. Alle Stämme wuchsen bis zu einer Verdünnung von 1×10^{-1} .

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe zeigen, dass die PPIase-Funktion eine große Bedeutung für das Wachstum bei extremen Temperaturen hat. Bei hohen Temperaturen ist kein Unterschied im Wachstum der Doppelmutante im Vergleich zu den Einzelmутanten zu beobachten. Bei niedrigen Temperaturen dagegen hat die Doppelmutante ein reduziertes Wachstumsverhalten was für eine gewisse gegenseitige Kompensation der PPIase-Funktionen von Mip und PpiB untereinander spricht.

5.5.3 Mip und PpiB spielen eine Rolle bei der Sliding Motility von *L. pneumophila*

Sliding Motility ist eine besondere Art der Fortbewegung für *L. pneumophila*, bei der weder Pili noch Flagellen zum Einsatz kommen. Diese Art der Motilität kommt durch die Ausschleusung von Tensiden zustande. Sowohl das T1SS, als auch das T2SS stehen mit der Bildung des Tensidfilms in Verbindung (Stewart *et al.*, 2009; Stewart *et al.*, 2011). Im Rahmen dieser Arbeit sollte analysiert werden, ob die PPIase-Aktivität die Sliding Motility von *L. pneumophila* beeinflusst. Diese Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Stefanie Krüger und Natascha Heinsohn durchgeführt (Heinsohn, 2013; Krüger, 2013). Dafür wurden 10 µl Bakteriensuspension aus einer stationären Übernachtskultur auf BCYE-Platten mit 0,5 % Agar aufgetropft und über 7 d, 14 d und 21 d bei 30 °C inkubiert. Für die Etablierung dieser Methode wurden zunächst die T1SS- und die T2SS-Mutante auf ihr Motilitätsverhalten hin überprüft. Die Ergebnisse sind in Abbildung 54 dargestellt. Der Wildtyp vergrößerte seine Koloniefläche über die Zeitpunkte stetig. Auch der ausgeschleuste Tensidfilm (gelb umrandet) nahm mit zunehmender Inkubationszeit zu. Die Kolonie der T1SS-Mutante $\Delta tolC$ vergrößerte sich dagegen kaum und es war auch nach 21 d kein Tensidfilm zu beobachten. Die T2SS-Mutante $\Delta lspDE$ vergrößerte ihre Fläche etwas stärker als $\Delta tolC$ und schleuste auch einen kleinen Tensidfilm aus. Insgesamt zeigten die T1SS- und T2SS-Mutanten gegenüber dem Wildtyp einen Defekt in der Ausschleusung von Tensiden, was eine verminderte Sliding Motility zur Folge hatte. Da dieser von Stewart *et al.* publizierte Phänotyp bestätigt werden konnte, wurden im weiteren Verlauf die PPIase-Mutanten getestet.

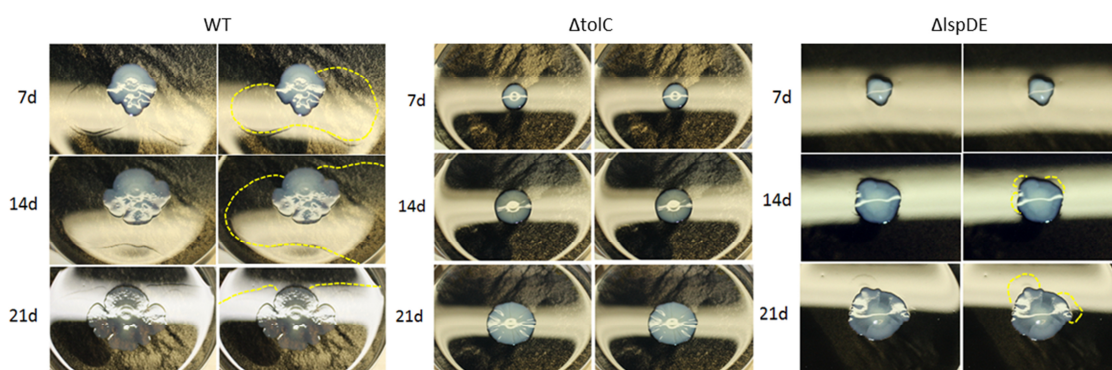


Abbildung 54: Sliding Motility von *Legionella*-Mutanten. Analyse der Sliding Motility von LpC Wildtyp, $\Delta tolC$, $\Delta lspDE$ bei 30 °C über 7 d, 14 d und 21 d. Der jeweilige Tensidfilm wurde mit einer gelben Umrandung markiert. Die T1SS- und T2SS-Mutante zeigten gegenüber dem Wildtyp eine geringere Sliding Motility, was womöglich auf die verminderte Ausschleusung von Tensidfilmen zurückzuführen ist.

Die Motilität der PPIase-Mutanten ist als Übersicht in Abbildung 55 dargestellt. Zusätzlich wurden die Fläche der Kolonie und die Fläche des Tensidfilms mit Hilfe von Photoshop quantifiziert (Abb. 56). Der Wildtyp erreichte nach 7 d eine durchschnittliche Koloniegröße von 1,4 cm². Nach 14 d vergrößerte sich diese Fläche 2,8-fach auf ca. 3,9 cm² und nach 21 d 1,5-fach auf 6 cm². Auch der Tensidfilm breitete sich von Woche zu Woche weiter aus. Nach 7 d war er 10 cm² groß, nach 14 d vergrößerte er sich 2,5-fach auf 25 cm² und nach 21 d fand eine erneute 1,6-fache Vergrößerung auf 40 cm² statt. Die Mip-Mutante hatte nach 7 d ebenfalls eine Koloniegröße von 1,4 cm². Nach 24 h vergrößerte sich die Fläche jedoch nur 2,5-fach auf 3,5 cm² und nach 21 d nur 1,5-fach auf 5,2 cm². Parallel dazu war auch der Tensidfilm kleiner als beim Wildtyp. Nach 7 d hatte er eine Größe von lediglich 2 cm², nach 14 d eine Größe von 9 cm² und nach 21 d eine Größe von 16 cm². Nach 21 d war der Tensidfilm der Mip-Mutante 2,5-fach kleiner als der des Wildtyps. Die Mip-Mutante zeigte also eine verminderte Tensidfilm-Bildung und eine verminderte Motilität. Die *ppiB*-Deletionsmutante erreichte nach 7 d eine Koloniefäche von 1 cm². Nach 14 d vergrößerte sich diese 3,4-fach auf 3,4 cm² und nach 21 d 1,3-fach auf 4,3 cm². Der Tensidfilm zeigte nach 7 d eine Größe von 6 cm². Nach 14 d nahm die Fläche 2,8-fach auf 17 cm² zu und nach 21 d 1,8-fach auf 30 cm². Die *ppiB*-Deletionsmutante zeigte im Vergleich zum Wildtyp und zu Δmip die kleinste Koloniegröße. Der Tensidfilm war jedoch größer als der der *mip*-Deletionsmutante und kleiner als der des Wildtyps.

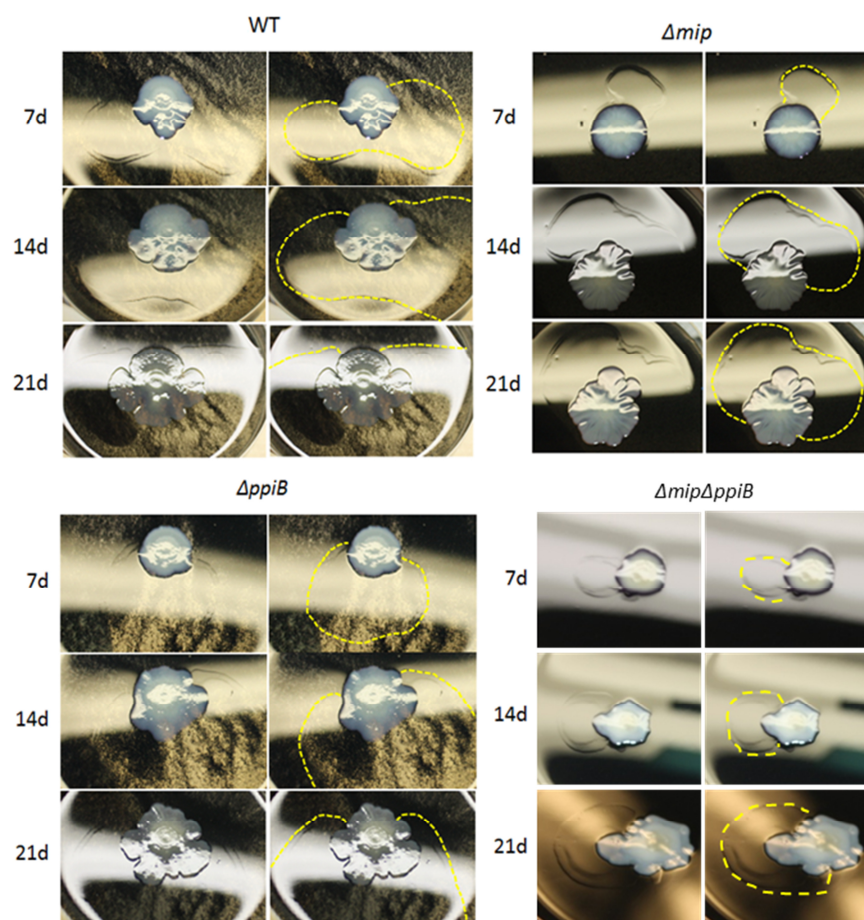


Abbildung 55: Sliding Motility von PPIase-Mutanten von *L. pneumophila*. Analyse der Sliding Motility von LpC Wildtyp, Δmip , $\Delta ppiB$ und $\Delta mip\Delta ppiB$ bei 30 °C über 7 d, 14 d und 21 d. Der der jeweilige Tensidfilm wurde mit einer gelben Umrandung markiert. Die PPIase-Mutanten zeigten gegenüber dem Wildtyp eine verringerte Tensidfilm-Bildung, was eine verminderte Sliding Motility zur Folge hatte.

Die Doppelmutante hatte nach 7 d die kleinste Koloniefläche mit 0,9 cm². Nach 14 d vergrößerte sie sich 2,3-fach auf 2,1 cm² und nach 21 d 1,9-fach auf 4 cm². Damit hatte die Doppelmutante verglichen mit den anderen Stämmen zu jedem Messzeitpunkt die kleinste Koloniefläche. Nach 7 d war der Tensidfilm nur 1 cm² groß. Die Fläche vergrößerte sich nach 14 d 4-fach auf 4 cm² und nach 21 d 1,25-fach auf 5 cm². Die Doppelmutante zeigte insgesamt den mit Abstand kleinsten Tensidfilm, verglichen mit den anderen Stämmen.

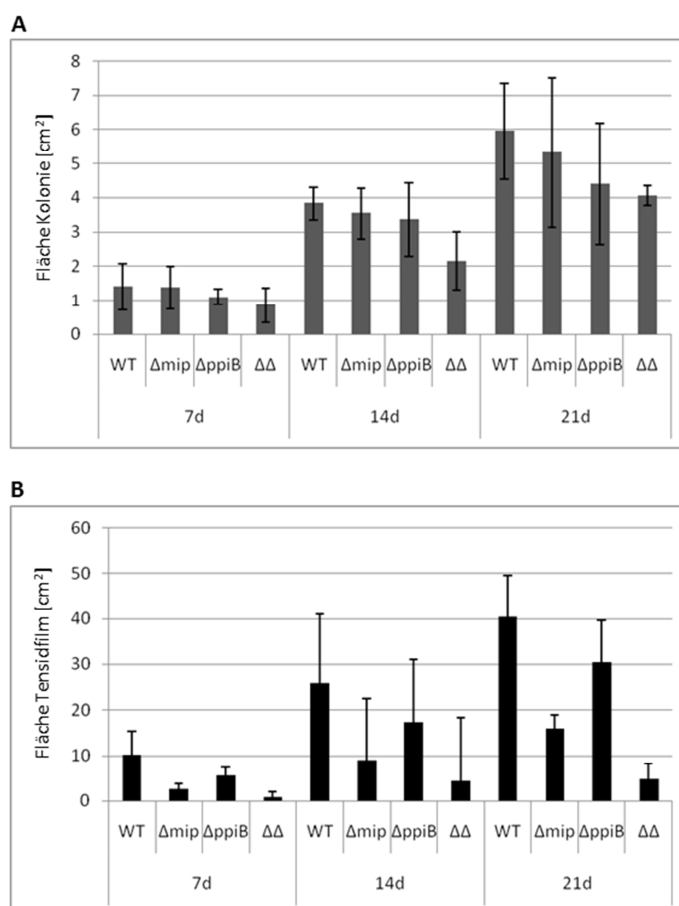


Abbildung 56: Quantifizierung der Sliding Motility von *Legionella*-Mutanten. Quantifizierung der (A) Kolonie- und (B) Tensidfilmfläche von LpC Wildtyp, Δmip , $\Delta ppiB$ und $\Delta mip\Delta ppiB$ ($\Delta\Delta$) bei 30 °C über 7 d, 14 d und 21 d. Die PPIase-Mutanten bildeten weniger Tensidfilm aus, als der Wildtyp. Daraus resultierte eine verringerte Sliding Motility, was zu einer kleineren Koloniefläche führte. Das Fehlen beider PPIasen verursachte den stärksten Phänotyp.

Insgesamt fällt auf, dass die PPIase-Einzelmutanten eine verringerte Tensidfilmbildung aufweisen und parallel dazu auch eine verringerte Sliding Motility haben. Die Koloniefläche korreliert jedoch nicht mit der Tensidfilmfläche. Die Doppelmutante zeigte den am stärksten ausgeprägten Defekt in der Sliding Motility. Sind beide PPIasen deletiert, verringert sich die Fähigkeit zur Sliding Motility also zusätzlich. Damit konnte gezeigt werden, dass zum einen die Sliding Motility PPIase-abhängig ist und zum anderen, dass die PPIasen Mip und PpiB, in diesem Fall ihre PPIase-Funktion, sich gegenseitig bis zu einem gewissen Grad kompensieren können.

5.5.3.1 Die PPIase-Doppelmutante zeigt eine geringere intrazelluläre Replikation in *A. castellanii* als Δmip

In vorangegangenen Analysen wurde gezeigt, dass die PPIase PpiB einen leichten Einfluss auf die intrazelluläre Replikation in *A. castellanii* aufweist, was auf eine geringere Invasionsrate zurückzuführen ist (Schmidt *et al.*, 1996). Ebenso kann sich eine *mip*-Deletionsmutante schlechter intrazellulär in den Amöben vermehren (Wintermeyer *et al.*, 1995). Um herauszufinden, in welchem Ausmaß sich die Doppelmutante in *A. castellanii* replizieren kann, wurden Acanthamoeben wie bereits beschrieben mit dem Wildtyp, *dotA*⁻, Δmip , $\Delta ppiB$, und $\Delta mip\Delta ppiB$ infiziert.

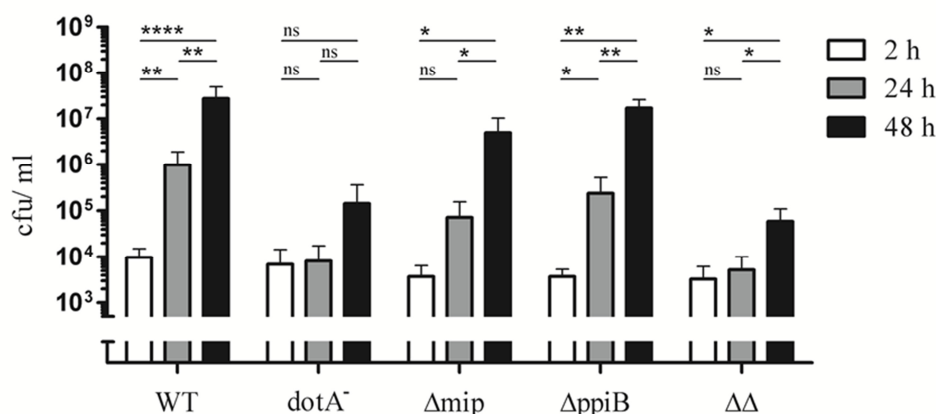


Abbildung 57: Infektion von *A. castellanii* mit unterschiedlichen PPIase-Mutanten. *A. castellanii* wurde mit dem LpC Wildtyp, *dotA*⁻, Δmip , $\Delta ppiB$ und $\Delta mip\Delta ppiB$ ($\Delta\Delta$) infiziert. Die Ansätze wurden nach 2 h, 24 h und 48 h ausplattiert und die cfu-Werte bestimmt. Die Signifikanz wurde mit einem einseitigen Student's *t*-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 % errechnet (**p* ≤ 0,05; ***p* ≤ 0,01; ****p* ≤ 0,001; *****p* ≤ 0,0001). Die Doppelmutante vermehrte sich schlechter in *A. castellanii* als Δmip .

In Abbildung 57 ist die intrazelluläre Replikation der verschiedenen Stämme über die Zeit dargestellt. Der Wildtyp replizierte sich über die Zeitpunkte konstant. Nach 2 h wurde eine Zellzahl von 1 × 10⁴ cfu/ ml ermittelt, nach 24 h stieg sie auf 1 × 10⁶ cfu/ ml und nach 48 h auf 3 × 10⁷ cfu/ ml. Die Vermehrung wurde als signifikant verifiziert. Der Stamm *dotA*⁻ blieb zwischen 2 und 24 h dagegen bei ca. 1 × 10⁴ cfu/ ml, und multiplizierte sich nach 48 h leicht, jedoch nicht signifikant auf 2 × 10⁵ cfu/ ml. Die *mip*-Deletionsmutante vermehrte sich zwischen 2 h und 24 h nicht signifikant 17,5-fach

auf 7×10^4 cfu/ml. Von 24 h auf 48 h multiplizierte sie sich auf einen cfu-Wert von 6×10^6 /ml. Sowohl die Vermehrung zwischen 24 h und 48 h als auch die zwischen 2 h und 48 h war signifikant ($*p \leq 0,05$). Die *ppiB*-Deletionsmutante erreichte nach 2 h 3×10^3 cfu/ml. Nach 24 h replizierte sie sich 66,67-fach auf 2×10^5 cfu/ml und nach 48 h erneut 100-fach auf 2×10^7 cfu/ml. Alle Vermehrungsschritte waren signifikant. Die intrazelluläre Replikation von $\Delta ppiB$ war im Vergleich zum Wildtyp nach 24 h 5-fach vermindert, war aber 2,9-fach höher als die der *mip*-Deletionsmutante. Die Doppelmutante hatte nach 2 h einen cfu-Wert von 2×10^3 /ml, welcher nach 24 h nicht signifikant auf 5×10^3 cfu/ml stieg.

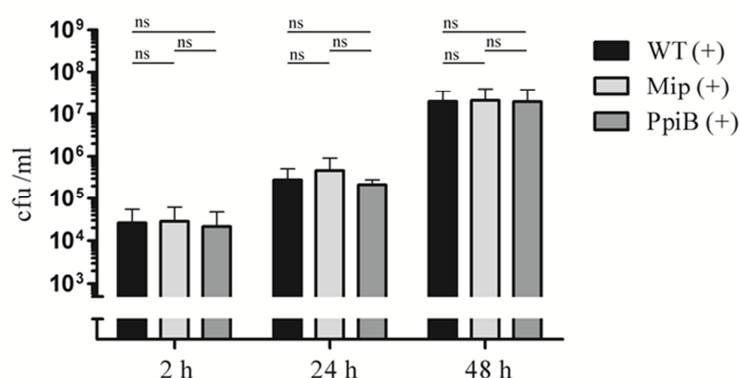


Abbildung 58: Infektion von *A. castellanii* mit *Legionella*-Komplementanten. *A. castellanii* wurde mit dem LpC Wildtyp (+), Mip (+) und PpiB (+) infiziert. Die Ansätze wurden nach 2 h, 24 h und 48 h ausplattiert und die cfu-Werte bestimmt. Die Signifikanz wurde mit einem einseitigen Student's *t*-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 % errechnet. Alle drei Stämme vermehrten sich zwischen 2 h, 24 h und 48 h ohne signifikanten Unterschied.

Nach 48 h vermehrte sich die Doppelmutante signifikant ($*p \leq 0,05$) im Vergleich zum 24 h-Wert auf 3×10^4 /ml. Die gesamte Vermehrung zwischen 2 h und 48 h wurde ebenso als signifikant verifiziert ($*p \leq 0,05$). Insgesamt erreichte die Doppelmutante nach 24 h nur eine 14-fach geringeren und nach 48 h einen 200-fach geringeren cfu-Wert als Δmip und vermehrte sich insgesamt so gering wie *dotA*.

Zur Verifizierung der Beobachtungen wurde *A. castellanii* wie bereits beschrieben mit den Komplementanten WT (+), Mip (+) und PpiB (+) infiziert. Die Ergebnisse der Infektion sind in Abbildung 58 dargestellt. Alle drei Stämme vermehren sich wie erwartet zwischen 2 h, 24 h und 48 h ohne signifikanten Unterschied.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass jede der beiden PPIasen eine Rolle bei der intrazellulären Replikation in *A. castellanii* spielt, denn werden in einem Stamm beide PPIasen deletiert, vergrößert sich der Replikationsdefekt. Dies deutet auf eine kompensatorische Wirkung von Mip und PpiB während der Infektion hin.

5.5.3.2 PpiB beeinflusst die intrazelluläre Replikation in Makrophagen

Für die nähere Charakterisierung des Infektionsverhaltens der PpiB- und der Doppelmutante, sollte die Replikation der beiden Stämme in THP-1-Makrophagen untersucht werden. Als Kontrollstamm für den natürlichen Infektionsverlauf wurde der Wildtyp verwendet. Als interne Kontrolle dienten *dotA*⁻ und die *mip*-Deletionsmutante.

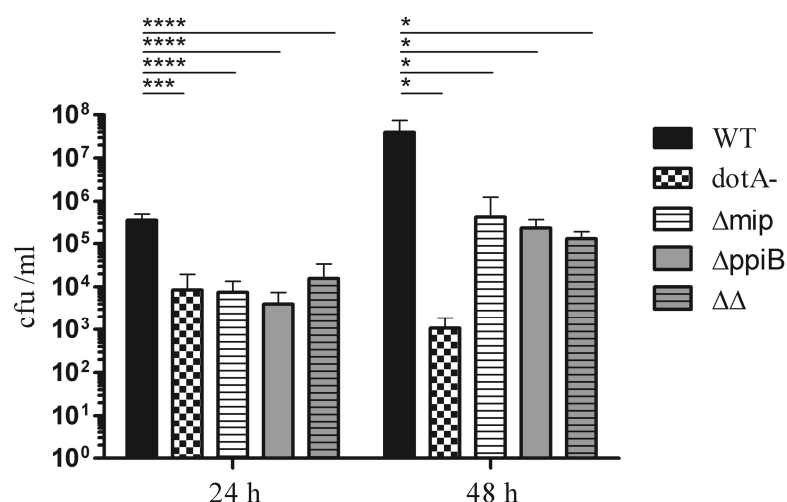


Abbildung 59: Infektion von THP-1-Makrophagen mit Legionellen. THP-1-Makrophagen wurden mit dem LpC Wildtyp, *dotA*⁻, Δ *mip*, Δ *ppiB* und Δ *mip* Δ *ppiB* ($\Delta\Delta$) infiziert. Die Ansätze wurden nach 24 h und 48 h ausplattiert und die cfu/ ml bestimmt. Die Signifikanz wurde mit einem einseitigen Student's *t*-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 % errechnet (**p* ≤ 0,05; *****p* ≤ 0,0001). Die *ppiB*-Deletionsmutante und die Doppelmutante zeigten eine verringerte intrazelluläre Replikation in Makrophagen.

In Abbildung 59 ist die intrazelluläre Replikation der verschiedenen Stämme im Verlauf der Zeitpunkte zu sehen. Beim Vergleich der Stämme nach 24 h zeigte sich, dass der Wildtyp einen cfu-Wert von ca. 5 × 10⁵/ ml erreichte, die replikationsgeschwächten Mutanten *dotA*⁻ und Δ *mip* dagegen nur einen Wert von ca. 9 × 10³ cfu/ ml. Ebenso verringert war der cfu-Wert der *ppiB*-Deletionsmutante mit 4 × 10³/ ml und der

Doppelmutante mit 1×10^4 / ml. Der Replikationsunterschied der Mutanten zum Wildtyp wurde als signifikant verifiziert. Nach 48 h vermehrte sich der Wildtyp auf einen cfu-Wert von ca. 4×10^7 / ml, was im Vergleich zum 24 h-Wert einer 80-fachen Vermehrung entsprach. Der cfu-Wert der DotA-Mutante verringerte sich auf 1×10^3 / ml und die Mip-Mutante vermehrte sich auf 4×10^5 cfu/ ml. Auch $\Delta ppiB$ und $\Delta mip\Delta ppiB$ replizierten sich auf 2×10^5 cfu/ ml und 1×10^5 cfu/ ml zu. Insgesamt vermehrten sich die PPIase-Mutanten im Vergleich zueinander sowohl nach 24 h als auch nach 48 h in etwa gleich stark und zeigten insgesamt eine schlechtere intrazelluläre Replikation als der Wildtyp.

Parallel wurde das Replikationsverhalten der Komplementationsstämme WT (+), Mip (+) und PpiB(+) in THP-1-Makrophagen untersucht, um beobachtete Phänotypen bestätigen zu können. Die Ergebnisse der Infektion sind in Abbildung 60 dargestellt.

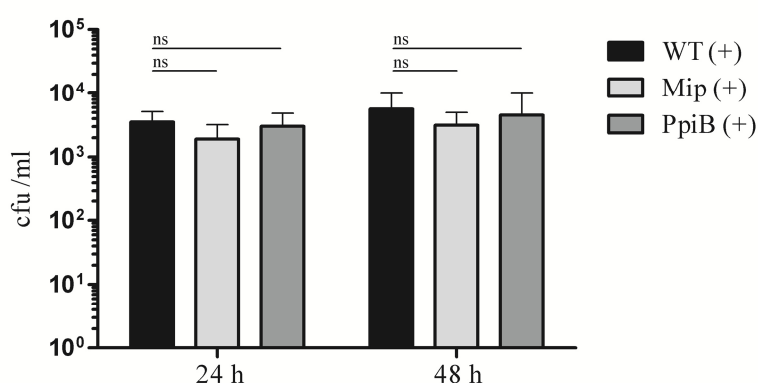


Abbildung 60: Infektion von THP-1-Makrophagen mit *Legionella*-Komplementanten. THP-1-Makrophagen wurde mit dem LpC Wildtyp (+), Mip (+) und PpiB (+) infiziert. Die Ansätze wurden nach 24 h und 48 h ausplattiert und die cfu-Werte bestimmt. Die Signifikanz wurde mit einem einseitigen Student's *t*-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 % errechnet. Alle drei Stämme vermehrten sich zwischen 2 h, 24 h und 48 h ohne signifikanten Unterschied.

Insgesamt erreichten die Mip- und die PpiB-Komplementante die gleichen Zellzahlen wie der komplementierte Wildtyp. Der Phänotyp der verminderten intrazellulären Replikation konnte also erfolgreich komplementiert werden.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass PpiB genauso wichtig für die intrazelluläre Replikation in THP-1-Makrophagen ist, wie Mip. Die doppelte Deletion der beiden PPIasen konnte keine zusätzliche Verringerung der Replikation hervorrufen. In

Makrophagen findet also vermutlich keine Kompensation der PPIasen untereinander statt.

5.5.4 *Legionella*-Sekretome können die effiziente Replikation der PPIase-Mutanten in Makrophagen komplementieren

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Zugabe des Wildtyp und Δmip -Sekretoms während einer Makrophageninfektion die effiziente Replikation der *mip*-Deletionsmutante wiederherstellen kann. Um herauszufinden, ob dies auch bei der *ppiB*- und Doppelmutante der Fall ist, wurde die Infektion mit allen Stämmen wiederholt. Für die Durchführung wurden THP-1-Zellen mit dem Wildtyp und der *mip*-Deletionsmutante infiziert und je das native Sekretom einer Wildtyp-Kultur ($OD_{600}=3$), einer Δmip -Kultur ($OD_{600}=3$), einer $\Delta ppiB$ -Kultur ($OD_{600}=3$) und einer $\Delta mip\Delta ppiB$ -Kultur ($OD_{600}=3$) zugegeben. Alle Ansätze wurden nach 24 h und 48 h ausplattiert und die cfu pro ml bestimmt (Abb. 61). Nach 24 h hatte der Wildtyp eine cfu von ca. 1×10^6 pro ml erreicht. Durch die Zugabe der Sekretome konnte keine signifikante Steigerung der Bakterienzahl hervorgerufen werden. Alle Wildtyp-Infektionsansätze, zu denen Sekretom hinzugefügt wurde, erreichten einen cfu-Wert von ca. 1×10^6 / ml. Nach 48 h war ebenso keine Steigerung der cfu durch die Zugabe von Sekretom zu beobachten. Alle Ansätze hatten zu diesem Zeitpunkt einen cfu-Wert von ca. 3×10^7 / ml. Die *Mip*-negative Mutante erreichte nach 24 h nur einen cfu-Wert von 4×10^4 pro ml. Auch hier wurde durch das Zugeben der Sekretome keine signifikante Steigerung der intrazellulären Bakterienzahl beobachtet. Nach 48 h erhöhte sich der cfu-Wert des Wildtyps um das 10-fache auf 4×10^5 / ml. Die Ansätze mit zugefügtem Sekretom wiesen einen cfu-Wert von ca. 2×10^6 bis 4×10^6 / ml auf, unterschieden sich also signifikant von der Infektion ohne Sekretomzugabe. Durch die Zugabe der Sekretome konnte die Vermehrung von Δmip nach 48 h gesteigert werden. Die *PpiB*-negative Mutante erreichte nach 24 h einen cfu-Wert von 3×10^3 / ml. Durch die Sekretomzugabe konnte die Effizienz der intrazellulären Replikation nicht signifikant gesteigert werden. Nach 48 h erreichte $\Delta ppiB$ einen cfu-Wert von 2×10^5 / ml. Durch die Anwesenheit der Sekretome während der Infektion wurde die Zahl der intrazellulären Bakterien 10-fach auf 2×10^6 cfu/ ml gesteigert.

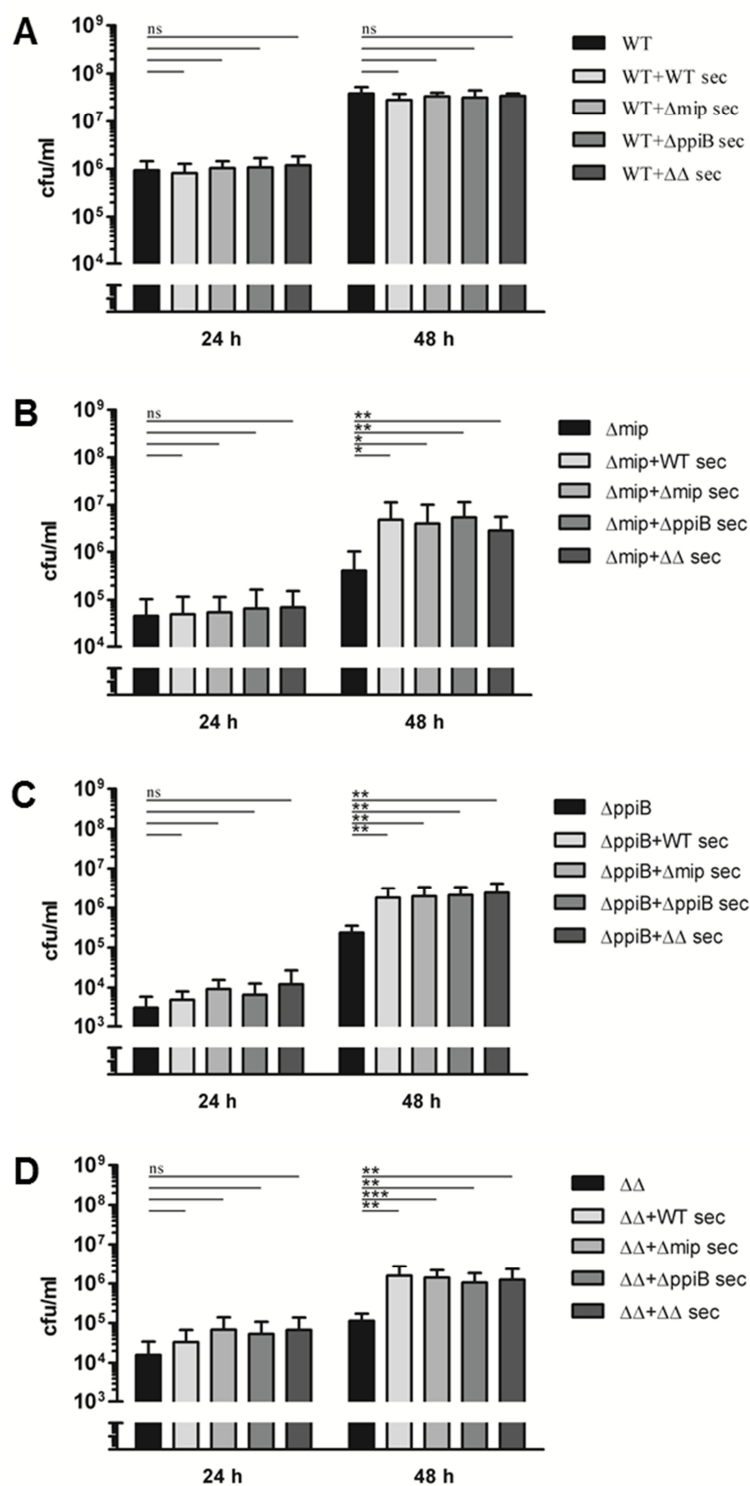


Abbildung 61: Infektion von THP-1 Makrophagen mit Legionellen unter Zugabe von *Legionella*-Sekretomen. THP-1 Makrophagen wurden mit WT, Δmip , $\Delta ppiB$ und $\Delta mip\Delta ppiB$ ($\Delta\Delta$) infiziert. Zu jedem Stamm wurden je 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Sekretom jedes Stamms zugefügt. Der cfu-Wert der Ansätze wurde nach 24 und 48 h bestimmt. Die Signifikanz wurde mit einem einseitigen Student's *t*-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 % errechnet (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$). Der Replikationsnachteil der PPIase-Mutanten konnte durch die Zugabe aller Sekretome komplementiert werden.

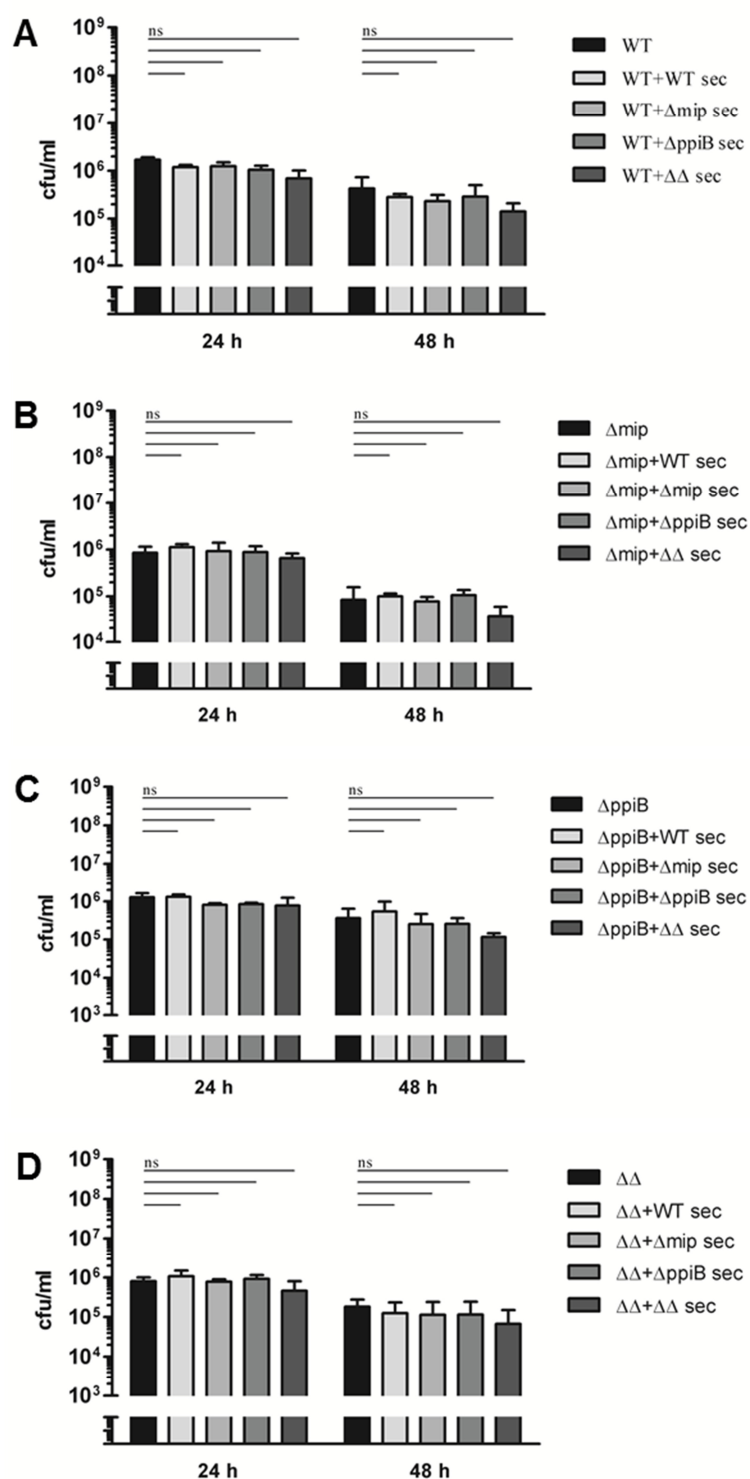


Abbildung 62: Wachstum von Legionellen unter Zugabe von *Legionella*-Sekretomen. (A) WT, (B) *Δmip*, (C) *ΔppiB* und (D) *ΔmipΔppiB* ($\Delta\Delta$) wurden unter Zusatz von je 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Sekretom jedes Stamms in RPMI kultiviert. Der cfu-Wert der Ansätze wurde nach 24 und 48 h bestimmt. Die Signifikanz wurde mit einem einseitigen Student's *t*-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 % errechnet. Die Zugabe der Sekretome beeinflusste das Wachstum der PPIase-Mutanten in RPMI nicht.

Diese Steigerung war signifikant (** $p \leq 0,01$). Bei der Doppelmutante wurde nach 24 h ein cfu-Wert von 2×10^4 / ml beobachtet, die durch die Zugabe von Sekretom nicht signifikant erhöht werden konnte. Auch hier konnte nach 48 h der cfu-Wert von 3×10^5 / ml durch die Zugabe von Sekretom 6,67-fach auf 2×10^6 / ml gesteigert werden. Insgesamt wurde gezeigt, dass nach 48 h sowohl die effiziente Replikation der PPIase-Einzelmutanten als auch die der Doppelmutante durch die Zugabe des Sekretoms von WT, Δmip , $\Delta ppiB$ und $\Delta mip\Delta ppiB$ komplementiert werden konnte. Bei Zugabe der Sekretome zum Wildtyp war keine Veränderung des cfu-Werts zu beobachten. Um zu zeigen, dass diese Komplementation nicht stattfand, weil das Sekretom das Wachstum von Legionellen in RPMI allgemein fördert, wurden Wachstumsversuche unter der Zugabe von Sekretomen durchgeführt. Dazu wurde in RPMI ein anfänglicher cfu-Wert von 1×10^6 / ml eingestellt und die Ansätze nach 24 h und 48 h ausplattiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 62 zu sehen. Die Legionellen waren nicht in der Lage sich in RPMI zu vermehren. Die Zellzahl nahm bei allen Ansätzen nach 48 h ab. Bei allen Stämmen mit und ohne Sekretomzugabe konnte nach 24 h ein cfu-Wert von ca. 1×10^6 / ml beobachtet werden, ohne dass ein signifikanter Unterschied bestand. Nach 48 h lagen die cfu-Werte der Ansätze zwischen 1×10^5 / ml und 1×10^6 / ml. Auch zu diesem Zeitpunkt war kein signifikanter Unterschied zwischen den Ansätzen mit und ohne Sekretom zu beobachten. Insgesamt wurde also gezeigt, dass die Zugabe von *Legionella*-Sekretomen das Wachstum von Legionellen in RPMI nicht fördert. Damit wurde bestätigt, dass nach 48 h die effiziente Replikation der PPIase-Mutanten durch die Zugabe von *Legionella*-Sekretomen komplementiert werden kann.

5.5.4.1 PpiB beeinflusst die intrazelluläre Replikation in HLTEs

Bei den vorangegangenen Infektionsexperimenten wurde beobachtet, dass PpiB eine Rolle bei der intrazellulären Replikation in *A. castellanii* und THP-1-Makrophagen spielt. Um herauszufinden, welche Rolle PpiB bei der Infektion von humanem Lungengewebe mit *L. pneumophila* spielt, wurde der Replikationsverlauf im Zellverband der HLTEs analysiert. Auch hier wurden der Wildtyp und die replikationsgeschwächten Stämme *dotA*⁻ und Δmip als Kontrollstämme verwendet. Das explantierte, humane Lungengewebe wurde infiziert und nach 2 h, 24 h und 48 h

gewogen, homogenisiert und die Anzahl der intrazellulären Bakterien durch Ausplattieren bestimmt. In Abbildung 63 ist das Ergebnis dargestellt. Nach 2 h wurde beim Wildtyp eine Zellzahl von 4×10^6 cfu/ g Gewebe ermittelt, nach 24 h stieg diese auf 2×10^7 cfu/ g Gewebe und nach 48 h auf 7×10^7 cfu/ g Gewebe. Die Vermehrung wurde als signifikant verifiziert. Der Stamm *dotA*⁻ lag nach 2 h dagegen bei ca. 6×10^6 cfu/ g Gewebe, multiplizierte sich nach 24 h leicht auf 8×10^6 cfu/ g Gewebe und nach 48 h auf ca. $1,3 \times 10^7$ cfu/ g Gewebe. Die Vermehrung der DotA-Mutante war zu keinem Zeitpunkt signifikant. Die *mip*-Deletionsmutante vermehrte sich zwischen 2 h und 24 h 2,5-fach auf ca. $1,5 \times 10^7$ cfu / g Gewebe. Von 24 h auf 48 h replizierte sie sich geringfügig auf eine cfu von 2×10^7 pro g Gewebe. Sowohl die Vermehrung zwischen 2 h und 24 h als auch die zwischen 24 h und 48 h war nicht signifikant. Die gesamte Vermehrung zwischen 2 h und 24 h wurde jedoch als signifikant verifiziert (** $p \leq 0,01$). Beide Kontrollstämme zeigten im Vergleich zum Wildtyp eine schlechtere intrazelluläre Replikation.

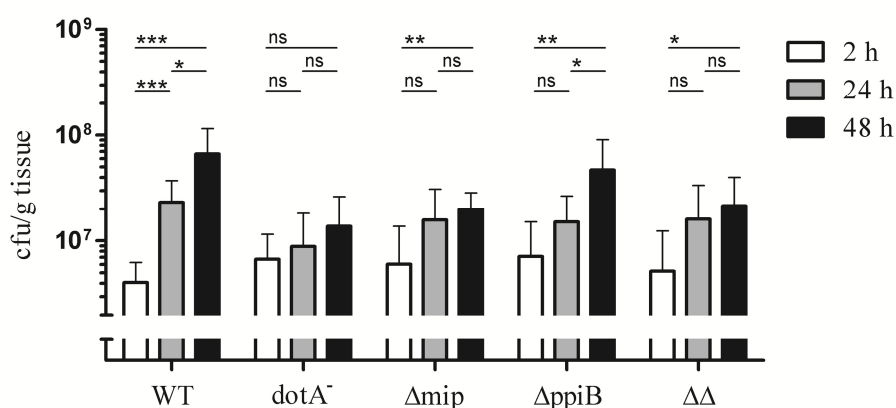


Abbildung 63: Einfluss von PPIasen auf die Infektion im HLTE-Modell. HLTEs wurden mit dem LpC Wildtyp, *dotA*⁻, Δmip und $\Delta ppiB$ und $\Delta mip \Delta ppiB$ ($\Delta\Delta$) infiziert (n=5). Die Ansätze wurden nach 2 h, 24 h und 48 h homogenisiert, ausplattiert und die cfu bestimmt. Die Signifikanz wurde mit einem einseitigen Student's *t*-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 % errechnet (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$). PpiB und Mip waren wichtig für die intrazelluläre Replikation in HLTEs.

Die *ppiB*-Deletionsmutante vermehrte sich in etwa so stark wie Δmip . Nach 2 h wurde ein cfu-Wert von 7×10^6 / g Gewebe ermittelt. Nach 24 h vermehrte sich die Zellzahl nicht signifikant auf ca. $1,5 \times 10^7$ cfu/ g Gewebe. Nach 48 h erreichte die *ppiB*-Deletionsmutante mit 4×10^7 cfu/ g Gewebe einen 2-fach gesteigerten cfu-Wert im

Vergleich zum 24 h-Wert. Dieser Vermehrungsschritt war signifikant (* $p \leq 0,05$). Für die gesamte Vermehrung zwischen 2 h und 48 h konnte ebenso eine Signifikanz errechnet werden (** $p \leq 0,01$). Bei der Doppelmutante wurde nach 2 h ein cfu-Wert von 3×10^6 / ml ermittelt. Nach 24 h erreichte $\Delta mip \Delta ppiB$ ein cfu-Wert von $1,5 \times 10^7$ / ml. Damit glichen sich die absoluten cfu-Werte von Δmip , $\Delta ppiB$ und $\Delta mip \Delta ppiB$ nach 24 h. Nach 48 h replizierte sich die Doppelmutante auf eine cfu von 2×10^7 / ml.

Es wurde insgesamt gezeigt, dass sich $\Delta ppiB$ zwischen 2 h und 24 h genauso schwach vermehrten wie Δmip und $\Delta mip \Delta ppiB$. Lediglich nach 48 h konnte die $ppiB$ -Deletionsmutante einen höheren cfu-Wert erreichen als die anderen beiden Stämme. Sowohl PpiB als auch Mip sind also wichtig für die intrazelluläre Replikation in HLTEs. Die doppelte Deletion der beiden PPIasen konnte keine zusätzliche Verringerung der Replikation hervorrufen. Wie auch schon in Makrophagen gezeigt, konnte in HLTEs eine Kompensation der PPIasen untereinander ausgeschlossen werden.

5.5.5 Die PPIase-Mutanten haben ein unterschiedliches Sekretom-Profil

Bisher wurde gezeigt, dass die mip -Deletionsmutante ein anderes Sekretomprofil als der Wildtyp hat. Es liegt die Vermutung nahe, dass die verminderte Virulenz in Zusammenhang mit dem veränderten Sekretomprofil steht. Da auch die $ppiB$ -Deletionsmutante und die Doppelmutante eine verminderte intrazelluläre Replikation aufwiesen, stellt sich die Frage, ob auch diese Mutanten ein verändertes Sekretomprofil haben. Für die Analyse dieser Fragestellung wurden Wachstumsversuche in YEB durchgeführt und nach mehreren Zeitpunkten die OD_{600} und die Proteinkonzentration im zellfreien Kulturüberstand bestimmt. In Abbildung 64 sind die optische Dichte des Wildtyps (blau), der Mip-Mutante (rot), der PpiB-Mutante (orange) und der Doppelmutante (schwarz) im Verhältnis zur Proteinkonzentration [$\mu\text{g}/\text{ml}$] dargestellt. Mit steigender OD_{600} stieg bei allen Stämmen die Menge der sezernierten Proteine. Ab einer OD_{600} von 1 erhöhte sich die Konzentration der extrazellulären Proteine der mip -Deletionsmutante und der Doppelmutante stärker an als die vom Wildtyp und der $ppiB$ -Deletionsmutante. Ab einer OD_{600} von ca. 1,4 sezernierte die mip -Deletionsmutante mehr Proteine als die Doppelmutante. Nachdem die OD_{600} von ca. 1,6 überschritten war,

waren im Überstand der *ppiB*-Deletionsmutante mehr Proteine im Überstand als beim Wildtyp. Alle Kurven verlaufen sigmoidal. Die Kurve des Wildtyps hat die geringste Steigung, dann folgt die der *ppiB*-Deletionsmutante, dann die der Doppelmutante und am steilsten verläuft die Kurve der *mip*-Deletionsmutante. Ab einer OD₆₀₀ von ca. 2 ging die Proteinsekretion in die stationäre Phase über. Der Wildtyp erreichte eine maximale durchschnittliche Proteinkonzentration von ca. 25 µg/ ml, Δmip von ca. 48 µg/ ml, $\Delta ppiB$ von ca. 38 µg/ ml und $\Delta mip\Delta ppiB$ von ca. 41 µg/ ml. Insgesamt wurde gezeigt, dass alle drei Mutanten unterschiedlich viele Proteine sezernieren.

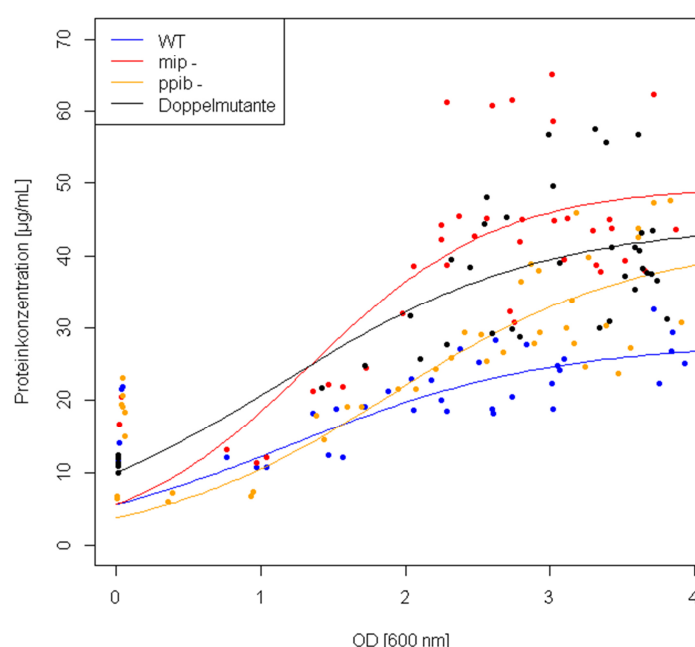


Abbildung 64: Wachstumsversuche mit Bestimmung der Proteinkonzentration im zellfreien Kulturüberstand. *L. pneumophila* WT, Δmip , $\Delta ppiB$ und $\Delta mip\Delta ppiB$ wurden in YEB-Medium kultiviert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die OD₆₀₀ bestimmt und aus dem zellfreien Kulturüberstand die Proteinkonzentration mit Hilfe von Roti-Nanoquant ermittelt. Alle Mutanten sezernierten mehr Proteine als der Wildtyp.

Um herauszufinden, ob die Unterschiede sich auch auf das Sekretomprofil der PPIase-Mutanten auswirken, wurden die Sekretome mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Dafür wurden Vorkulturen der vier Stämme bei einer OD₆₀₀ von 3 geerntet und die Proteinkonzentration des zellfreien Kulturüberstandes gemessen. Von dem mit

Trichloressigsäure gefällten Sekretom des Wildtyps wurden je 10 µg auf das Gel aufgetragen. Der optische Vergleich der Sekretome (Abb. 65) zeigt, dass in den Spuren der PPIase-Mutanten keine zusätzlichen Banden vorhanden waren. Was jedoch auffiel war, dass einige Proteinbanden eine höhere oder geringere Intensität hatten, als Banden der gleichen Höhe beim Wildtyp. Einige bestimmte Proteine im Sekretom der PPIase-Mutanten lagen akkumuliert oder reduziert vor. Obwohl die Sekretomkonzentration der *ppiB*-Deletionsmutante der des Wildtyps glich, unterschied sich das Profil doch. Gleiches war bei Δmip und $\Delta mip\Delta ppiB$ zu beobachten. Vor allem bei der Doppelmutante fiel auf, dass einige Proteine weniger stark sezerniert wurden.

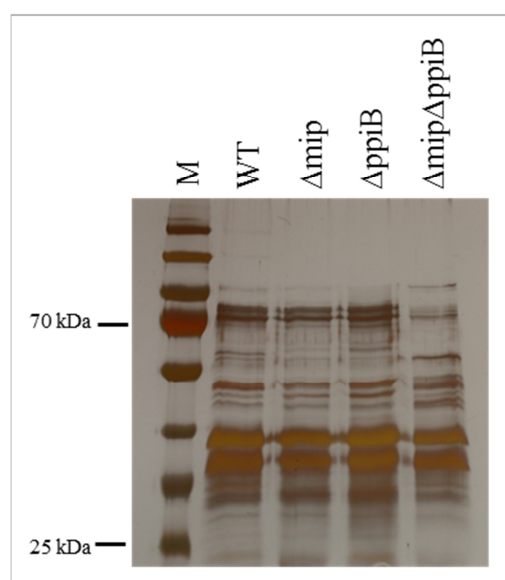


Abbildung 65: SDS-PAGE der Sekretome der PPIase-Mutanten. Vorkulturen der Stämme wurden bei einer OD_{600} von 3 geerntet und die Proteinkonzentration des zellfreien Kulturüberstandes gemessen. Die mit Trichloressigsäure gefällten Sekretome von WT, Δmip , $\Delta ppiB$ und $\Delta mip\Delta ppiB$ wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit einer Silberfärbung sichtbar gemacht. Als Marker wurde die Page Ruler Prestained Protein Ladder #SM0672 verwendet. Die PPIase-Mutanten hatten ein anderes Proteinprofil als der Wildtyp.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass alle Mutanten unterschiedlich viele Proteine sezernieren, was einen Unterschied im Sekretomprofil zur Folge hat. Die PPIasen Mip und PpiB spielen also beide eine Rolle bei der Sekretion von Proteinen.

5.5.6 Das Sekretom der *mip*-Deletionsmutante löst keinen Gewebeschaden in HLTEs aus

Es wurde gezeigt, dass die replikationsgeschwächten PPIase-Mutanten ein unterschiedliches Sekretomprofil haben. Bei der *mip*-Deletionsmutante liegen viele Proteine akkumuliert im Überstand vor. Eine mögliche Begründung dafür ist, dass die akkumulierten Proteine in keiner aktiven Form vorliegen, da Mip die Aktivierung nicht vornehmen kann. Dies hätte zur Folge, dass die Bakterienzelle immer mehr von diesem Protein sezerniert, damit die Funktion des Proteins gewährleistet ist. Vor dem Hintergrund, dass der Gewebeschaden in HLTEs von Proteinen des Sekretoms, wie z.B. ProA, ausgelöst wird (unpublizierte Daten), wurde die Aktivität der Sekretome überprüft. Dafür wurden HLTEs mit je 40 µg Sekretom des Wildtyps, der Mip-negativen Mutante, der *ppiB*-Deletionsmutante und der Doppelmutante inkubiert. Als Vergleich dienten uninfizierte HLTEs. Nach 2, 24 und 48 h wurden die infizierten HLTEs mit der HOPE-Technik fixiert, dehydratisiert und in Paraffinblöcke gegossen. Die Gewebeschnitte wurden mit Hämatoxilin-Eosin gefärbt. Für die Bestimmung des Damage Scores wurden Proben von drei verschiedenen Patienten begutachtet. In Abbildung 66 ist der quantifizierte Gewebeschaden der Ansätze dargestellt. Das Gewebe der Mediumkontrolle wurde nach zweistündiger Infektion bei einem Damage Score von 1 eingeordnet. Nach 24 Stunden verschlechterte sich die alveolare Integrität weshalb der Damage nun bei 2 einordnet. Nach 48 h hatte die Gewebestruktur einen Damage Score von 3. Das Gewebe zeigte nach zweistündiger Inkubation mit dem Wildtyp-Sekretom gleichen Gewebeschaden wie die Kontrolle und wurde bei einem Wert von 1 eingeordnet. Nach 24 h erreichte die Schädigung aber einen Wert von 5 und nach 48 h lag der Damage Score bei 7. Das Sekretom des *Legionella*-Wildtyps war also in der Lage menschliches Lungengewebe zu zerstören. Die Inkubation der HLTEs mit dem Sekretom der Mip-negativen Mutante löste Gewebeschaden mit einem Wert von 1 aus. Der Gewebeschaden erhöhte sich nach 24 h auf Stufe 3 und nach 48 h auf Stufe 4. Die Inkubation mit dem Sekretom der *ppiB*-Deletionsmutante löste nach 2 h einen Damage von 1 aus, nach 24 h lag er bei 5 und nach 48 h bei 7. Damit glich der vom *AppiB*-Sekretom verursachte Gewebeschaden dem des vom WT-Sekretom ausgelösten. Bei den HLTEs die mit dem Sekretom der Doppelmutante inkubiert wurden, wurde

nach 2 h ein Damage Score von 1 beobachtet, nach 24 h lag er weiterhin bei 1 und nach 48 h erhöhte er sich auf 3.

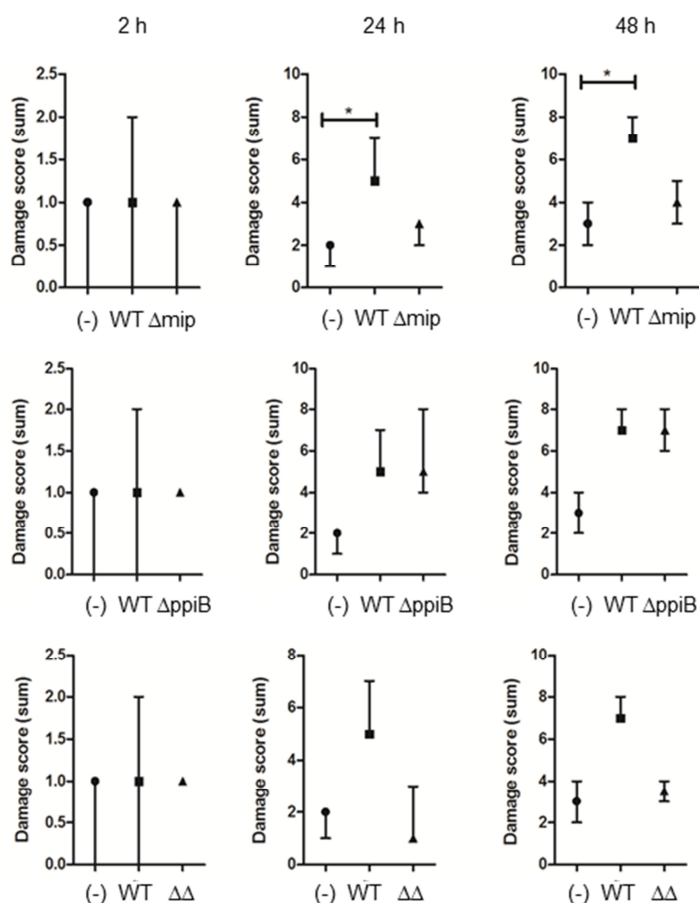


Abbildung 66: Damage Score von mit *Legionella*-Sekretomen inkubierten HLTEs. HLTEs wurden für 2, 24 und 48 h unter Zusatz von den Sekretomen von WT, Δmip , $\Delta ppiB$ und $\Delta mip\Delta ppiB$ ($\Delta\Delta$) inkubiert. Für jeden Zeitpunkt und jede Bedingung der Infektion wurde der histologische Gewebeschaden klassifiziert. Bewertet wurden die Kategorien Protein-Exudat, Delaminierung der Epithelzellen und Integrität der alveolaren Septen auf einer Skala von 0-3. Aus den Damage Scores aller drei Patienten wurden der Median und der Interquartilsabstand bestimmt. Die Signifikanz wurde mit dem Friedmanns Test (nicht parametrisch) und dem Dunns Mehrfachvergleich bestimmt (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$). Der Replikationsnachteil der PPIase-Mutante kann durch die Zugabe aller Sekretome komplementiert werden. Das mit dem Sekretom der Mip-negativen Mutante und der Doppelmutante inkubierte Lungengewebe weist nach 24 h und 48 h einen geringeren Schaden auf als das mit dem Wildtyp inkubierte.

Zusammengefasst fällt auf, dass der vom WT-Sekretom ausgelöste Gewebeschaden genauso stark ist, wie der vom *AppiB*-Sekretom verursachte Schaden. Dem Schädigungsgrad des Gewebes ohne Sekretom entsprechen dagegen die Ansätze mit *Amip*- und *AmipAppiB*-Sekretom. Ein verringerter Gewebeschaden kommt also nur bei der Inkubation von HLTEs mit Sekretomen von Stämmen vor, in denen das Mip-Protein deletiert ist. Die Deletion von PpiB hat im Gegenzug dazu keinen Einfluss auf den Grad der Schädigung verursacht durch das Sekretom. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass Mip eine regulatorische Funktion hat und die Aktivität des Sekretoms beeinflussen kann.

5.5.6.1 Die Isolation von rekombinantem PpiB

Für die weitere Charakterisierung sollte der Virulenzfaktor PpiB rekombinant produziert und aufgereinigt werden. Mit dem rekombinanten Protein sollten u.a. Bindungsstudien mit dem Mip-Protein durchgeführt werden. Zu Beginn wurde das Gen *ppiB* amplifiziert (PpiB_F2 und PpiB_R2) und zusammen mit dem Vektor pET-52b (+) mit Hilfe von *Sac I* und *Sma I* geschnitten.

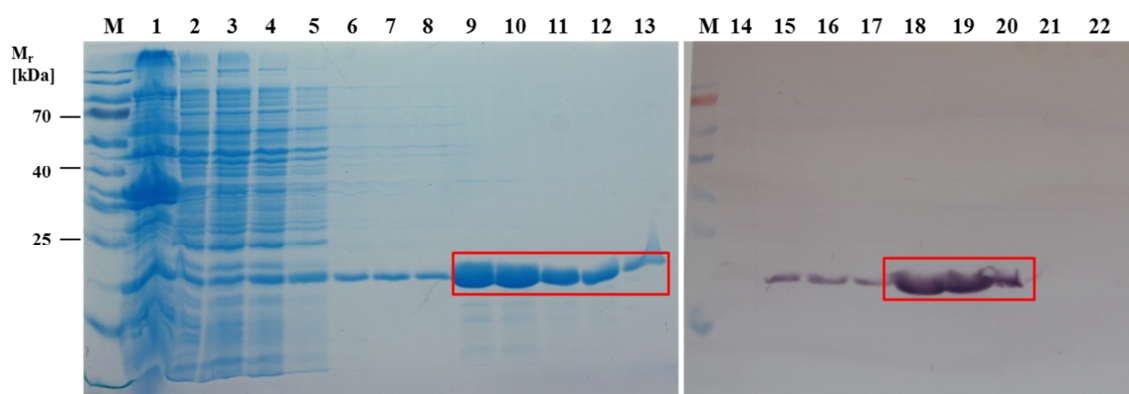


Abbildung 67: SDS-PAGE und Western Blot der Aufreinigung des rekombinanten PpiB_Strep. Eine induzierte Kultur des Produktionsstammes wurde geerntet und nach Zellaufschluss wurde das Protein über eine *Strep*-Tactin Säule aufgereinigt. M: Page Ruler Prestained Protein Ladder #SM0672 1: Sediment 2: Überstand 3: Durchfluss 4-7: Waschfraktion 1,2,4 und 5 8-13: Elutionsfraktion 1-6 14: Sediment 15: Durchfluss 16: Waschfraktion 5 17-22: Elutionsfraktion 1-6. Das rekombinante Protein PpiB_Strep (rot) kann mit Hilfe dieses Systems in reiner Form aufgereinigt werden.

Nach der Ligation wurde das Vektor-Konstrukt in *E. coli* Rosetta Gami-2 (DE3) gebracht. Der Vektor pET-52b(+) trägt einen Streptavidin-Tag, der nach der Ligation als N-terminaler Tag für das rekombinante PpiB fungiert. Nach Verifikation eines intakten Produktionsstammes via PCR wurde dieser kultiviert, induziert und die Bakterien geerntet. Der Zellaufschluss erfolgte via French Press und die anschließende Reinigung über eine *Strep*-Tactin Säule (Iba). Die Ergebnisse sind in Abbildung 67 dargestellt. Auf der SDS-PAGE sind neben einer Probe aus dem Sediment nach Zellaufschluss, die Proben des Überstandes, des Durchflusses, der verschiedenen Waschschrte und der Elutionen aufgetragen. In jeder Fraktion ist eine Bande auf der Höhe von ca. 20 kDa zu erkennen. Dies entspricht in etwa der Größe von PpiB, die bei ca. 18 kDa liegt. Der Western Blot, angefärbt mit anti-Strep-Antikörper, bestätigt, dass es sich um rekombinantes PpiB handelt. Auch schon während des Waschens löst sich etwas PpiB von der Säule. Das meiste Protein wird jedoch bei der Elution freigesetzt. Das rekombinante Protein liegt nach der Elution in einer sehr reinen Form vor. Dieses System eignet sich also sehr gut für die Produktion von rekombinantem PpiB. Das aufgereinigte Protein kann für weitere Studien verwendet werden.

5.6 Einfluss von neuen Cycloheximid-Derivaten auf das Wachstum von Legionellen

Nachdem in den vorangegangenen Kapiteln das Mip-Protein ausführlich charakterisiert werden konnte, beschäftigt sich das nächste Kapitel mit der Analyse der PPIase-Domäne des Mip-Proteins. In diesem Teil der Arbeit war es das Ziel, neu synthetisierte Mip-PPIase-Inhibitoren hinsichtlich ihrer Wirkung auf das Wachstum und die intrazelluläre Replikation von *L. pneumophila* zu untersuchen.

5.6.1 Neue Imid-substituierte Cycloheximidderivate haben eine starke FKBP-inhibierende Wirkung

Bei der Suche nach neuen FKBP-Inhibitoren ohne immunsuppressive Nebenwirkungen wurden von Martin Theuerkorn und Matthias Weiwad von der Universität Halle neun Imid-substituierte Cycloheximidderivate synthetisiert. Zwei der Substanzen (MT_30.3

und MT30.9) wurden mit Hilfe eines Tert-Butylamins als funktionelle Gruppe hergestellt, während die restlichen Substanzen eine Adamantan-basierte Substitution tragen. Die inhibitorische Wirkung dieser Verbindungen auf humanes FKBP12 und Mip (*L. pneumophila*) wurde in einem Protease-gekoppeltem PPIase Assay mit dem chromogenen Peptidsubstrat Succinyl-Ala-Phe-Pro-Phe-4-nitroanilid gemessen.

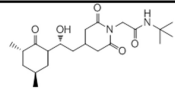
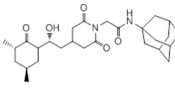
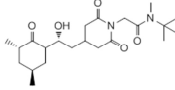
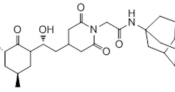
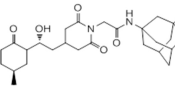
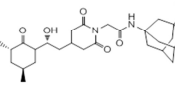
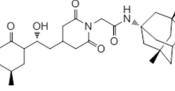
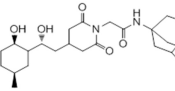
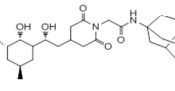
Substanz	Struktur	IC ₅₀ (FKBP12)	IC ₅₀ (Mip)
MT_30.3		2.0 ± 0.1 µM	33.8 ± 8.6 µM
MT_30.8		0.4 ± 0.04 µM	8.5 ± 2.1 µM
MT_30.9		36.1 ± 4.1 µM	31.7 ± 7.4 µM
MT_30.32		0.18 ± 0.05 µM	1.7 ± 0.2 µM
MT_30.38		1.2 ± 0.1 µM	21.8 ± 3.3 µM
MT_30.51		0.19 ± 0.06 µM	5.6 ± 1.1 µM
MT_30.79		0.22 ± 0.02 µM	4.9 ± 0.9 µM
MT_30.92		1.0 ± 0.1 µM	12.6 ± 1.4 µM
MT_30.93		0.9 ± 0.05 µM	16.3 ± 2.6 µM

Abbildung 19: PPIase-Inhibition von neuen Cycloheximid-Derivaten und ihre Strukturen. Die inhibitorische Wirkung dieser Verbindungen auf humanes FKBP12 und Mip wurde in einem Protease-gekoppeltem PPIase Assay mit dem chromogenen Peptidsubstrat Succinyl-Ala-Phe-Pro-Phe-4-nitroanilid gemessen (Rasch *et al.*, 2015).

Diese Versuche wurden von Martin Theuerkorn durchgeführt. Insgesamt haben alle Substanzen FKBP12 besser inhibiert als Mip (Abbildung 19). Eine Ausnahme ist der schlechteste Inhibitor MT_30.9, der IC₅₀-Werte von 36,1 ± 4,1 µM für FKBP12 und 31,7 ± 7,4 µM für Mip erreicht. Der beste Inhibitor für FKBP12 ist MT_30.32 (IC₅₀ 0,18 ± 0,05 µM hatte auch den niedrigsten IC₅₀ -Wert für Mip (1,7 ± 0,2 µM).

Diese Korrelation zwischen FKBP12 und Mip konnte auch für den zweitbesten Inhibitor MT_30.51 und den drittbesten Inhibitor MT_30.79 beobachtet werden. Bei diesen Derivaten sind die IC₅₀-Werte für Mip 25-fach höher als für FKBP12. Zusammenfassend haben alle Cycloheximid-Derivate eine inhibitorische Wirkung gegenüber FKBP12 und Mip, wobei MT_30.32 den stärksten Effekt gezeigt hat.

5.6.2 Cycloheximid-Derivate haben eine inhibitorische Wirkung auf das Wachstum von *L. pneumophila*

Da die Cycloheximid-Derivate in der Lage waren, die PPIase-Funktion von Mip zu hemmen, wurde im Folgenden der Einfluss dieser Substanzen auf das Wachstum vom *L. pneumophila* WT und Δmip analysiert. Für die Durchführung wurden die *Legionella*-Stämme in YEB-Medium in Anwesenheit von 10 zu 100 μ M des jeweiligen Inhibitors angezogen. Als Kontrollen wurden Ansätze ohne Inhibitor und mit Rapamycin als PPIase-Inhibitor mit immunsuppressiver Wirkung verwendet.

Substanz	WT		Δmip	
	Inhibition ^a	MIC ^b	Inhibition	MIC
MT_30.3	-	-	-	-
MT_30.8	-	-	-	-
MT_30.9	+	30	+	30
MT_30.32	+	30	+	30
MT_30.38	-	-	-	-
MT_30.51	+	30	+	30
MT_30.79	-	-	-	-
MT_30.92	+	40	+	40
MT_30.93	+	40	+	40
Rapamycin	+	40	+	40

Abbildung 20: Inhibition des Wachstums von *L. pneumophila* durch Cycloheximid-Derivate. *Legionella*-Stämme wurden in YEB-Medium in Anwesenheit von 10 zu 100 μ M des jeweiligen Inhibitors angezogen. Als Kontrollen wurden Ansätze ohne Inhibitor und mit Rapamycin als PPIase-Inhibitor verwendet. (MIC- *minimal inhibitory concentration*) Alle Inhibitoren außer MT_30.3, MT_30.8, MT_30.38 und MT_30.79 hemmten das Wachstum von *L. pneumophila* WT und Δmip (Rasch *et al.*, 2015).

Die Substanzen MT_30.9, MT30.32 und MT 30.51 hemmten das Wachstum von *L. pneumophila* ab einer Konzentration von 30 μ M komplett. Dagegen war bei den

Substanzen MT_30.92 und MT_30.93 eine komplette inhibitorische Wirkung ab 40 μ M zu beobachten. Die PPIase-Inhibitoren MT_30.3, MT_30.8, MT_30.38 und MT_30.79 haben dagegen keinen Einfluss auf die Viabilität der Legionellen. Interessanterweise gibt es bei der Hemmung des Wachstums keinen Unterschied zwischen Wildtyp und *mip*-Deletionsmutante. Eine weitere interessante Beobachtung ist, dass Rapamycin ebenso das Wachstum der Legionellen ab einer Konzentration von 40 μ M komplett inhibieren kann. MT_30.32, der stärkste Inhibitor des PPIase-Assays, wurde als repräsentativer Inhibitor verwendet, um auch andere klinisch-relevante Stämme zu testen. Darunter waren die Gram-negativen Spezies *Y. tuberculosis*, *P. aeruginosa* PA01, *S. enterica* subsp. *enterica*, *K. aerogenes*, *E. coli* K12 und der Gram-positive Pathogen *S. aureus*. Überraschenderweise wurde das Wachstum von keinem der getesteten Stämme durch MT_30.32 beeinflusst. Dies weist darauf hin, dass die antibakterielle Wirkung der Cycloheximid-Derivate nur auf wenige Spezies oder sogar ausschließlich auf *L. pneumophila* begrenzt ist (Daten nicht gezeigt).

5.6.3 Cycloheximid-Derivate mit Adamantyl-Substituierung inhibieren die intrazelluläre Replikation von *L. pneumophila*

Um herauszufinden, ob die getesteten PPIase-Inhibitoren nur das Wachstum von Legionellen inhibieren, oder auch einen Effekt auf die intrazelluläre Infektion haben, wurden Infektionsversuche gemacht. Dafür wurden THP-1-Makrophagen mit dem Wildtyp infiziert und nach 2 h je 10 bis 100 μ M der am stärksten hemmenden Substanzen MT_30.32 und MT_30.51 hinzugefügt. Alle Ansätze wurden nach 24 h und 48 h ausplattiert und die cfu pro ml bestimmt (Abb. 21A). Passend zu den Ergebnissen aus dem Protease-gekoppeltem PPIase-Assay und der minimalen Hemmkonzentration beim Wachstum konnten beide Substanzen die intrazelluläre Replikation inhibieren. Dieser Effekt war Konzentrations-abhängig und begann bei 50 μ M. Im Gegensatz dazu hatte MT_30.9, der zwar das bakterielle Wachstum inhibierte aber bei der Hemmung der PPIase-Aktivität von Mip 18-fach weniger effektiv war als MT_30.32, keinen inhibitorischen Effekt auf das intrazelluläre Wachstum in THP-1-Makrophagen.

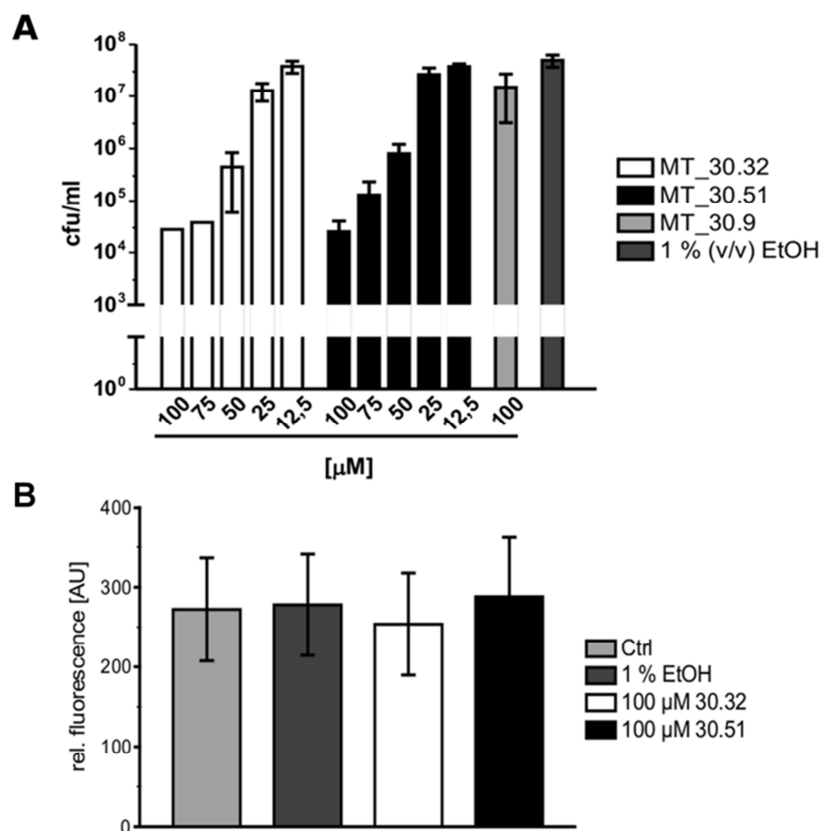


Abbildung 21: Infektion von THP-1-Makrophagen mit *L. pneumophila* unter Einfluss von MT_30.32, MT_30.51 und MT_30.9 und Zytotoxizitätsassay. (A) Die Inhibitoren wurden in Makrophagen-Infektionsassays mit Konzentrationen von 12,5 µM bis 100 µM getestet. Die Substanzen wurden nach einer initialen Infektionszeit von 2 h zugefügt. Nach 24 h wurden die Ansätze ausplattiert. Als Kontrolle diente 1 % (v/v) EtOH, da die Inhibitoren in Ethanol gelöst sind und dies der Endkonzentration im Infektionsansatz entspricht. Die PPIase-Inhibitoren MT_30.32 und MT_30.51 hatten eine inhibitorische Wirkung auf die intrazelluläre Replikation, MT_30.9 dagegen nicht. (B) Differenzierte THP-1-Makrophagen wurden für 24 h mit 100 µM der Inhibitoren inkubiert. Nach 20 h wurde Alamar Blue hinzugefügt und die Viabilität der Zellen wurde bei 590 nm gemessen. Keine der Substanzen hatte eine zytotoxische Wirkung auf THP-1-Makrophagen (Rasch *et al.*, 2015).

Um sicherzugehen, dass die Inhibition der Replikation nicht auf Nebeneffekte zurückzuführen ist, wurden als Kontrolle Zytotoxizitätsassays durchgeführt (Abb. 21B). Dabei wurde beobachtet, dass keine der getesteten Substanzen eine zytotoxische Wirkung auf THP-1-Makrophagen hatte. Insgesamt können die Substanzen MT_30.32 und MT_30.51 die intrazelluläre Replikation der Legionellen in THP-1-Makrophagen ab einer Konzentration von 50 µM hemmen.

5.7 Analyse der Interaktion zwischen Nematoden und Legionellen

Nachdem in den vorangegangenen Kapiteln von der Charakterisierung von Mip als Virulenzfaktor und der Analyse PPIase-Domäne des Proteins handelte, beschäftigt sich dieser Teil der Arbeit mit der Rolle von Mip in der Umwelt. Es wurde bereits gezeigt, dass das Mip-Protein an humanes Kollagen IV bindet (Wagner *et al.*, 2007; Ünal *et al.*, 2011). Da Kollagen IV als Bestandteil der extrazellulären Matrix der höheren Tiere ein hoch konserviertes Protein ist und *L. pneumophila* nachweislich in natürlichen Süßwasserhabitaten und Biofilmen vorkommt, wurde im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss von Mip auf die Besiedlung von Nematoden sowohl in natürlichen Habitaten als auch im Modellorganismus *C. elegans* untersucht (Atlas, 1999; Taylor *et al.*, 2009b).

5.7.1 Legionellen besiedeln Amöben und Nematoden aus natürlichen Biofilmen

Um die Hypothese näher zu untersuchen, ob Metazoen als Wirt zu der Persistenz, Verbreitung und Evolution der *Legionella*-Spezies beitragen, wurde ein Biofilm einer heißen Schwefelquelle in Soufre (Lake Bourget tributaries, Aix-les-Bains, Frankreich) identifiziert, in dem sowohl Legionellen als auch Amöben nachgewiesen wurden. Nach der Entnahme von schwimmenden Biofilmen von der Wasseroberfläche, konnten vorangegangene Beobachtungen über die Besiedlung des Biofilms mit *L. pneumophila* bestätigt werden (Chaabna *et al.*, 2013). Die thermale Quelle hat eine Temperatur von 37 °C, was eine optimale Wachstumstemperatur für Legionellen darstellt. Die gemessene *Legionella*-Konzentration schwankte zwischen 1 bis 12 Bakterien pro ml. Der Biofilm wurde im Rahmen dieser Arbeit auf die natürliche Interaktion von Legionellen mit Protozoen und invertebraten Metazoen des Biofilms untersucht. Um das Problem der geringen natürlichen Legionellenkonzentration im Thermalwasser zu umgehen, wurde etwas Biofilmmaterial mit *L. pneumophila* mCherry inkubiert, fixiert und mikroskopiert. Die Konzentration der Legionellen konnte somit erhöht werden und die Detektion wurde durch die mCherry-Markierung erleichtert.

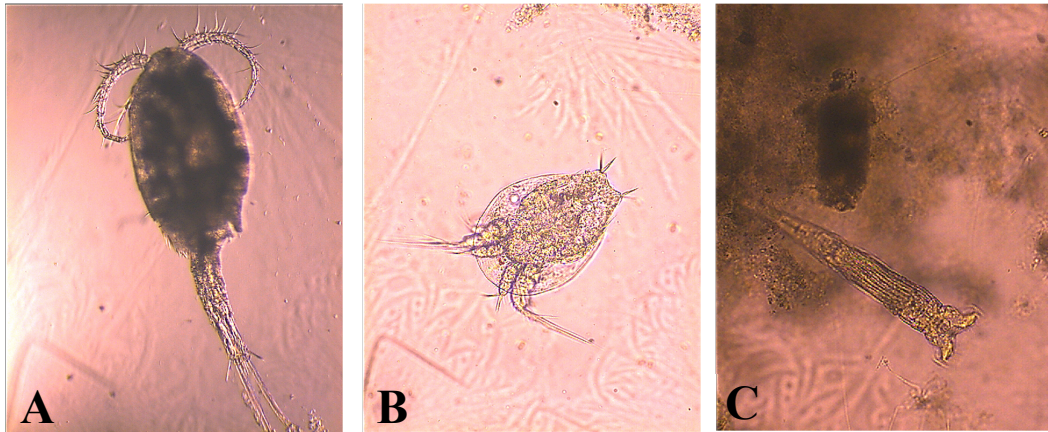


Abbildung 68: Mikroskopie der invertebraten Metazoen des infizierten Biofilms. Eine Probe wurde aus dem mit *L. pneumophila* mCherry infizierten Biofilm entnommen, fixiert und mikroskopiert. Metazoen in denen keine Legionellen nachgewiesen werden konnten, waren: (A) Copepoden, (B) Naupilus-Larven und (C) Rotiferen.

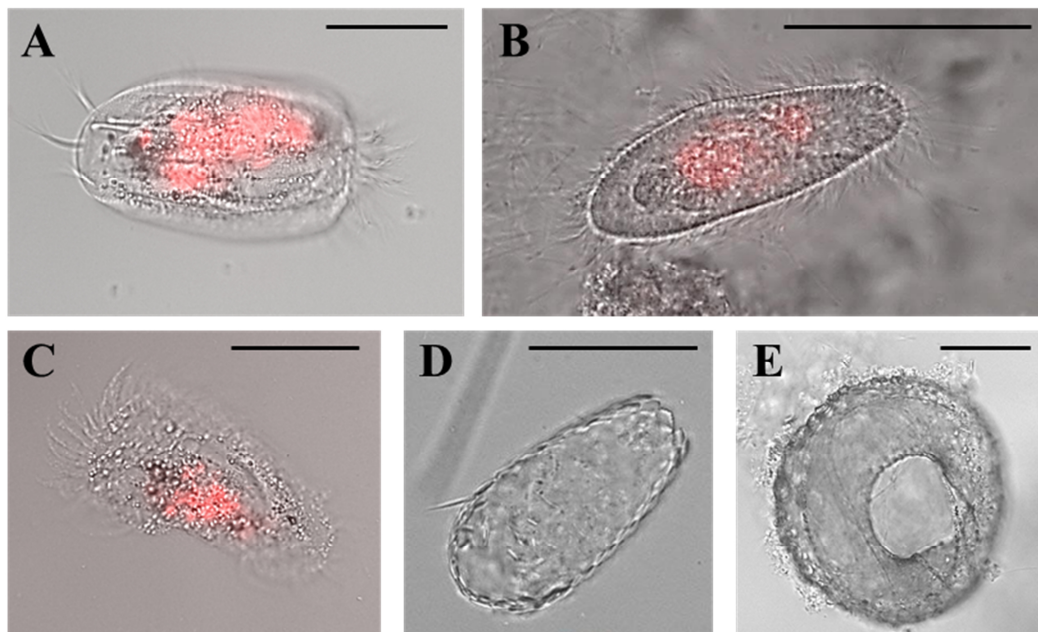


Abbildung 69: Mikroskopie der Protozoen des infizierten Biofilms. Eine Probe wurde aus dem mit *L. pneumophila* mCherry infizierten Biofilm entnommen, fixiert und mikroskopiert. Der Maßstabsbalken entspricht einer Größe von 50 μm . Die Identifikation wurde von Rolf Michel durchgeführt. Protozoen in denen Legionellen nachgewiesen werden konnten, waren: (A) *Oxytricha bifaria* (Oxytrichidae), (B) *Ciliophrya* sp. (Holophryidae) und (C) *Stylonychia mytilus* (Oxytrichidae). In (F) *Euglypha* sp. und (C) *Centropyxis* sp. wurden keine Legionellen beobachtet.

Die in Abbildung 68 dargestellten invertebraten Metazoen sind Bewohner des Biofilms. Die Copepoden, Naupilus-Larven und Rotiferen konnten nicht von Legionellen besiedelt werden. Außerdem sind im Biofilm auch einige Protozoen zu finden (Abb. 69). *L. pneumophila* ist in der Lage *Oxytricha bifaria*, *Ciliophrya sp.* und *Stylonychia mytilus* zu besiedeln. Dies wurde bisher nicht beschrieben und ist somit eine neue Erkenntnis. In *Centropyxis sp.* und *Euglypha sp.* konnten dagegen keine Legionellen nachgewiesen werden.

In Abbildung 70 sind einige Würmer zu sehen, die den Biofilm bewohnen. Nicht in allen Arten konnten Legionellen nachgewiesen werden. Vor allem in segmentierten Wurmern konnte keine Besiedlung durch Legionellen beobachtet werden. Insgesamt konnte dennoch gezeigt werden, dass die markierten, zugefügten Legionellen in der Lage waren, verschiedene Amöben und auch Nematoden des natürlichen Biofilms zu besiedeln.

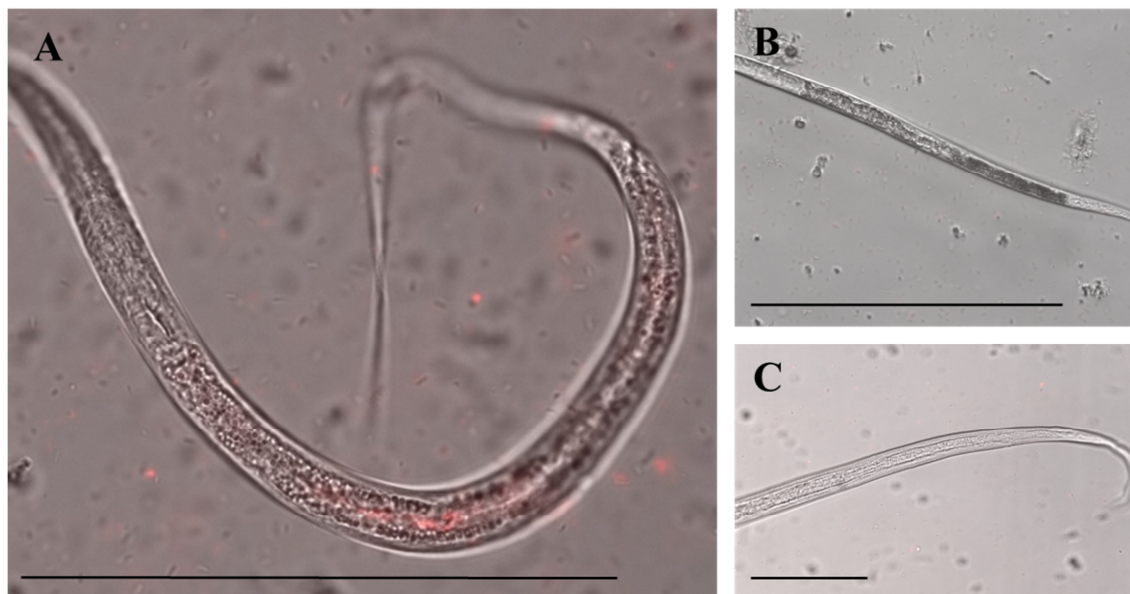


Abbildung 70: Mikroskopie der Nematoden des infizierten Biofilms. Eine Probe wurde aus dem mit *L. pneumophila* mCherry infizierten Biofilm entnommen, fixiert und mikroskopiert. Der Maßstabsbalken entspricht einer Größe von 100 μm . Nur manche Nematoden konnten von den zum Biofilm gegebenen Legionellen besiedelt werden.

5.7.2 Legionellen, Amöben und Nematoden interagieren miteinander

Unter Laborbedingungen konnte gezeigt werden, dass *L. pneumophila* in der Lage ist, den Darm von *C. elegans* zu besiedeln und sich darin zu vermehren (Komura *et al.*, 2010; Brassinga und Sifri, 2013; Hellinga *et al.*, 2015). Wie die Legionellen in der Umwelt von den Würmern aufgenommen werden und warum sie ihren Verdauungstrakt besiedeln, ist jedoch unklar. Es wurde beschrieben, dass *C. elegans* in der Lage ist, *D. discoideum* als Nahrungsquelle zu verwenden. Dabei saugen die Nematoden die Amöben aus und verdauen den Zellinhalt in ihrem Verdauungstrakt (Kessin *et al.*, 1996). Da Legionellen intrazellulär in Amöben vorkommen, sollte untersucht werden, ob intrazellulär in Amöben vorkommende Legionellen durch die Räuber-Beute-Beziehung von Nematoden und Amöben indirekt in den Darm von *C. elegans* gelangen können (Trojan-Horse-Infektion). Dafür wurden axenische *A. castellanii* mit *L. pneumophila* mCherry infiziert (MOI 2). Nach 2 h wurden die extrazellulären Bakterien mit Gentamicin abgetötet. Anschließend wurden die infizierten Amöben abgeklopft, aufkonzentriert und auf Agarplatten pipettiert. L4-Larven von *C. elegans* wurden gepickt und auf die Platten mit den infizierten Amöben überführt. Dieser Ansatz wurde über Nacht inkubiert.



Abbildung 71: Trojan-Horse-Infektion von *L. pneumophila*, *A. castellanii* und *C. elegans*. *A. castellanii* wurde mit *L. pneumophila* mCherry infiziert. Nach 2 h wurden die extrazellulären Bakterien mit Gentamicin abgetötet, die infizierten Amöben abgeklopft, aufkonzentriert und auf Agarplatten pipettiert. L4-Larven von *C. elegans* wurden dazugegeben und über Nacht inkubiert. Die Würmer und Amöben wurden dann fixiert und mikroskopiert. Der Maßstab entspricht einer Größe von 20 µm. Sowohl in den Acanthamoeben, als auch in den Nematoden wurden Legionellen nachgewiesen.

Die Würmer wurden anschließend fixiert und mikroskopiert. In Abbildung 71 A sind die mit Legionellen infizierten Amöben zu sehen. Es konnte beobachtet werden, dass fast alle Amöbenzellen mit Legionellen besiedelt waren. Abbildung 71 B und C zeigen Nematoden, die Legionellen aufgenommen haben (Pfeile). Die Bakterien befinden sich im Verdauungstrakt der Würmer. Die Legionellen scheinen also auch indirekt in den Darm von *C. elegans* gelangen zu können. Um zu verifizieren, dass es sich bei den aufgenommenen Bakterien nicht um extrazelluläre Bakterien handelt, die durch die Lyse der Amöben freigesetzt wurden, wurde ein erweitertes Experiment durchgeführt. Dafür wurde das Zytoplasma der infizierten Amöben mit dem Farbstoff Calcofluor angefärbt, bevor diese mit den L4-Larven auf die Agarplatten überführt wurden. In Abbildung 72 ist der Vergleich der Nematoden mit und ohne vorheriger Calcofluor-Behandlung der Amöben zu sehen. Nur bei Würmern, die mit Calcofluor gefärbte Amöben (72 B) aufgenommen haben, war am Pharynx eine blaue Färbung zu beobachten. Nach dem Aussaugen der Amöben bleibt also etwas Zytoplasma im Pharynx zurück.

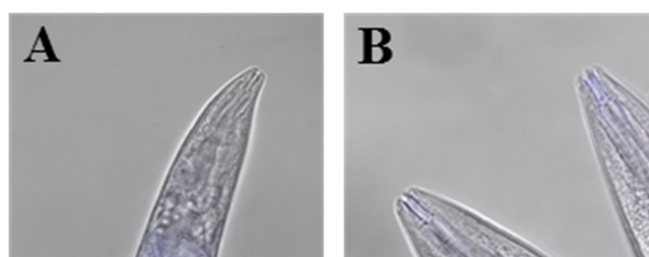


Abbildung 72: *C. elegans* nach der Aufnahme von gefärbten und ungefärbten *A. castellanii*. *A. castellanii* wurde mit *L. pneumophila* mCherry infiziert. Nach 2 h wurden die extrazellulären Bakterien mit Gentamicin abgetötet, die infizierten Amöben abgeklopft (A), oder mit Calcofluor gefärbt und dann abgeklopft. Nach der Aufkonzentration wurden sie mit L4-Larven von *C. elegans* auf Agarplatten überführt und über Nacht inkubiert. Die Würmer und Amöben wurden dann fixiert und mikroskopiert. Nur bei Würmern, die mit Calcofluor gefärbte Amöben aufgenommen haben, war am Pharynx eine blaue Färbung zu beobachten.

In Abbildung 73 ist ein ganzer Wurm aus diesem Infektionsansatz dargestellt. Zu beobachten ist, dass diese Nematode blaue Spuren am Pharynx aufweist und dass am Ende des Darms die Legionellen (rot) zu sehen sind. Generell wiesen alle Würmer, bei denen Legionellen im Darm nachgewiesen wurden, eine blaue Färbung am Pharynx auf.

Die Legionellen wurden also durch Aussaugen der Amöben in den Verdauungstrakt aufgenommen.



Abbildung 73: *C. elegans* nach der Aufnahme von gefärbten, infizierten *A. castellanii*. *A. castellanii* wurde mit *L. pneumophila* mCherry infiziert. Nach 2 h wurden die extrazellulären Bakterien mit Gentamicin abgetötet, die infizierten Amöben mit Calcofluor gefärbt und dann abgeklopft. Nach der Aufkonzentration wurden sie mit L4-Larven von *C. elegans* auf Agarplatten überführt und über Nacht inkubiert. Die Würmer und Amöben wurden dann fixiert und mikroskopiert. Der Maßstab entspricht einer Größe von 100 µm. Die Nematoden, bei denen Legionellen im Darm nachgewiesen wurden, haben eine blaue Färbung am Pharynx.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Legionellen indirekt über die natürliche Besiedlung von Amöben in den Darm von *C. elegans* gelangen können und dass Legionellen, Amöben und Nematoden miteinander interagieren können.

5.7.3 Mip beeinflusst das Überleben von *C. elegans* während der Besiedlung durch Legionellen

Um herauszufinden, ob das Legionella Mip-Protein einen Einfluss auf das Überleben von *C. elegans* während einer Infektion mit Legionellen hat, wurden L4-Larven gepickt und auf Agarplatten inkubiert, die mit verschiedenen *Legionella*-Stämmen bewachsen waren. Zu den Stämmen zählten der Wildtyp, *dotA*⁻, *Amip*, Mip (+) und *E. coli* OP50. Über 14 d wurde jeden Tag mikroskopisch die Anzahl der lebenden Würmer bestimmt. Ein Wurm wurde als tot erachtet, wenn er sich auch nach der Berührung mit dem Spatel nicht mehr bewegt hat und wenn keine Pharynxaktivität mehr zu beobachtet wurde. Nematoden, die nicht mehr auffindbar waren, wurden von der Auswertung

ausgeschlossen. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe der Kaplan-Meier-Methode ausgewertet und sind in Abbildung 74 dargestellt. Nach 2 d starben die ersten Würmer, die mit dem Wildtyp und Δmip gefüttert wurden. Einen Tag später waren die ersten toten Würmer bei der Fütterung mit der Mip-Komplementante zu beobachten. Erst nach 4 d starben die ersten Würmer, die mit $dotA^-$ und OP50 gefüttert wurden und zusätzliche bei den Stämmen WT und Δmip . Nach 7 d lebten nur noch 62,3 % der Nematoden, wie mit dem Wildtyp gefüttert wurden und 64 %, die mit OP50 gefüttert wurden. Dagegen lag die Überlebensrate bei Δmip noch bei 82,8 %, bei Mip (+) bei 78,9 % und bei $dotA^-$ 83,7 %.

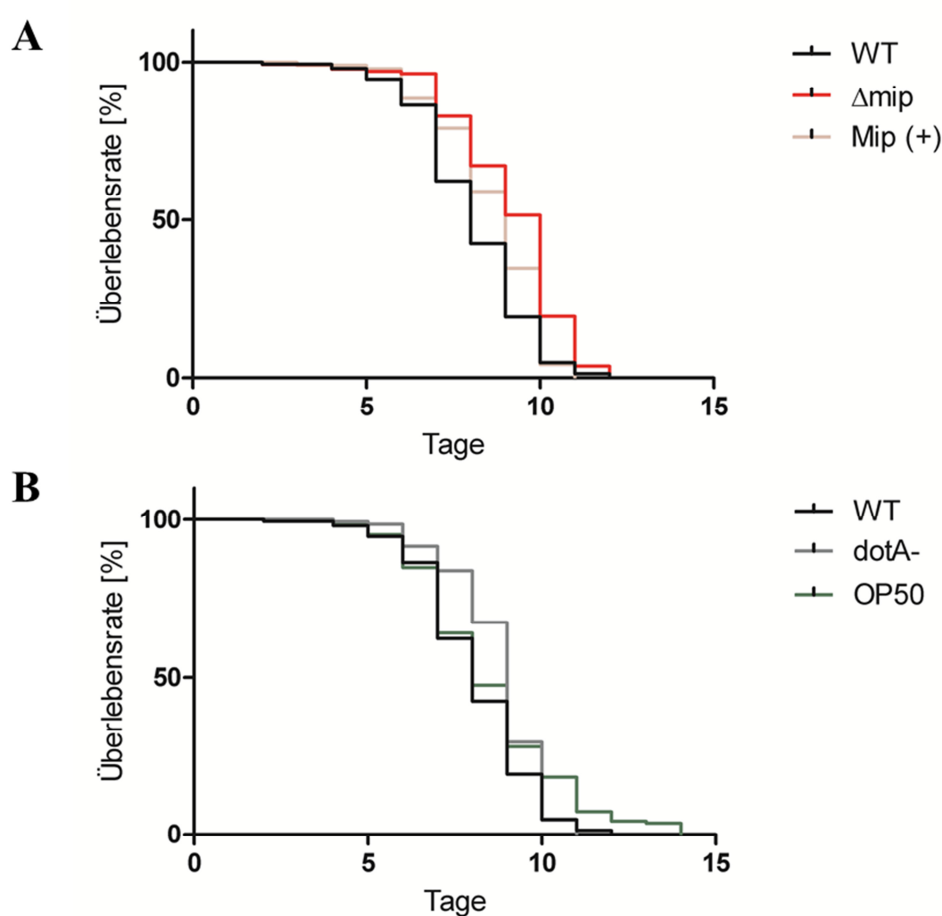


Abbildung 74: Überleben von *C. elegans* nach der Kolonisierung durch verschiedene *Legionella*-Stämme. *C. elegans* L4-Larven wurden mit (A) *L. pneumophila* WT (n=146), Δmip (n=134) und Mip (+) (n=95) und (B) *L. pneumophila* WT (n=146), $dotA^-$ (n=129) und *E. coli* OP50 (n=164) über 14 Tage inkubiert. Jeden Tag wurde die Anzahl der lebenden Würmer bestimmt. Verschwundene Würmer wurden von der Auswertung ausgenommen. Die Kultivierung von *C. elegans* mit der *mip*-Deletionsmutante führte zu einem verzögerten Absterben. Insgesamt hatten Würmer, die mit *L. pneumophila* kultiviert wurden eine kürzere Lebenserwartung, als die, die mit *E. coli* OP50 gefüttert wurden.

Nach 9 d war der Unterschied noch größer. Bei mit dem Wildtyp gefütterten Nematoden lebten nur noch 19,2 %, bei der Komplementante nur noch 34,7 %, bei *dotA*⁻ noch 29,5 % und bei OP50 noch 28 %. Wurden die Würmer allerdings mit der *mip*-Deletionsmutante kultiviert, waren nach 9 d noch 51,5 % am Leben. Nach 10 d kommt es dagegen zu einem sprunghaften Abfall der Vitalität, sodass nur noch 19,4 % der Nematoden lebten. Die letzten Würmer, die mit der Mip (+) und *dotA*⁻ gefüttert wurden, starben an Tag 11, die mit WT und *Δmip* gefütterten an Tag 12 und die mit OP50 gefütterten an Tag 14. Alle Kurven waren laut Log-rank-Test signifikant unterschiedlich voneinander. Der Median des Überlebens lag für den WT bei 8 Tagen, für *Δmip* bei 10 d, für Mip (+) bei 9 d, bei *dotA*⁻ bei 9 d und für OP50 bei 8 d. Die Abwesenheit des Mip-Proteins führte insgesamt also zu einer Verzögerung beim Absterben der Nematoden. Die Komplementation des Mip-Proteins war erfolgreich, da dies einen Anstieg des Medians zur Folge hatte. Auch die Fütterung mit *dotA*⁻ hatte ein verzögertes Absterben zur Folge, jedoch in einem geringeren Ausmaß als die Fütterung mit *Δmip*.

Insgesamt wurde gezeigt, dass sowohl das Mip-Protein, als auch das T4SS einen Einfluss auf das Überleben von mit Legionellen infizierten Nematoden haben.

5.7.4 Mip fördert die Besiedlung von *C. elegans* durch Legionellen

Welche Kolonisationsfaktoren bei der Besiedlung von *C. elegans* durch *L. pneumophila* eine Rolle spielen, ist bisher unbekannt. Da der Darm der Nematoden mit Kollagen IV ausgekleidet ist und die Legionellen an ihrer Oberfläche das Kollagen-bindende Mip-Protein haben, wurde der Einfluss von Mip auf die Besiedlung von *C. elegans* näher analysiert (Graham *et al.*, 1997; Wagner *et al.*, 2007). Dafür wurden L4-Larven von *C. elegans* gepickt und auf Agarplatten bewachsen mit der *mip*-Deletionsmutante für 24 h und 48 h inkubiert. Anschließend wurden die Würmer homogenisiert und die Anzahl der im Darm befindlichen Bakterien durch Ausplattieren ermittelt. Als Kontrolle dienten der *L. pneumophila* Wildtyp-Stamm und die Replikations-defiziente Mutante *dotA*⁻. Der Stamm *E. coli* OP50 wird für die Anzucht von *C. elegans* verwendet und wird deshalb auch als Kontrolle verwendet.

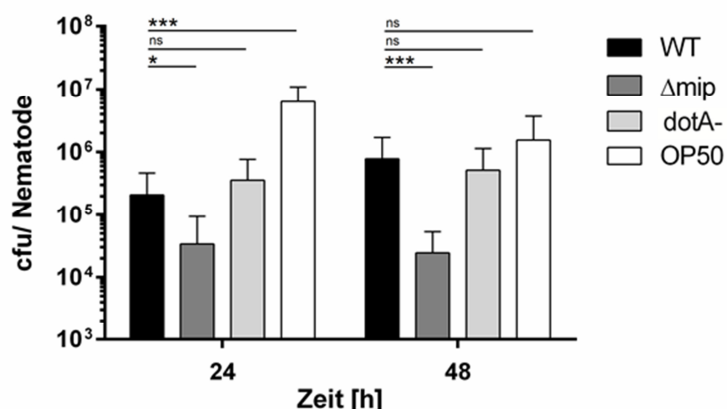


Abbildung 75: Quantifizierung der Kolonisierung von *C. elegans* durch verschiedene *Legionella*-Stämme und *E. coli* OP50. *C. elegans* L4-Larven wurden mit *L. pneumophila* WT, Δmip , $dotA^-$ und *E. coli* OP50 für 24 h und 48 h inkubiert. Dann wurden die Würmer homogenisiert und die Anzahl der im Darm befindlichen Bakterien durch Ausplattieren bestimmt. Die Signifikanzberechnung wurde mit Hilfe des ungepaarten Fischers-*t*-Test durchgeführt (* $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$). Bei der Kultivierung von *C. elegans* mit der *mip*-Deletionsmutante wurden weniger Bakterien im Darm nachgewiesen als bei der Kultivierung mit dem Wildtyp.

Diese Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Stefanie Krüger durchgeführt (Krüger, 2013). Die Ergebnisse sind in Abbildung 75 dargestellt. Nach 24 h wurde beim Wildtyp-Ansatz ein cfu-Wert von 2×10^5 / Nematode beobachtet. Die *mip*-Deletionsmutante wies dagegen einen 6,66-fach geringeren cfu-Wert auf als der Wildtyp. Der Stamm *dotA*⁻ zeigte im Vergleich zum Wildtyp einen leicht erhöhten cfu-Wert von 3×10^5 / Nematode. Die höchste Bakterienkonzentration wurde beim Vergleichsstamm OP50 festgestellt. Dieser erreichte einen cfu-Wert von 6×10^6 / Nematode. Nach 48 h veränderte sich die Konzentration des Wildtyps im Vergleich zu 24 h 2,5-fach auf einen cfu-Wert von 8×10^5 / Nematode. Die Mip-Mutante zeigte keine Vermehrung und wies einen cfu-Wert von 2×10^4 / Nematode auf. Der cfu-Wert der DotA-Mutante lag nach 48 h bei 5×10^5 / Nematode und der von OP50 bei nur noch $1,5 \times 10^6$ / Nematode.

Insgesamt konnte beobachtet werden, dass bei der Kultivierung von *C. elegans* mit der *mip*-Deletionsmutante weniger Bakterien im Darm zurückblieben als bei der Kultivierung mit anderen Stämmen. Die DotA-Mutante zeigte jedoch keinen Effekt. Das Mip-Protein spielt also eine Rolle bei der effizienten Besiedlung von *C. elegans*-Därmen durch *L. pneumophila*.

6 Diskussion

6.1 Mip als indirekter Virulenzfaktor

Das Moonlighting-Protein Mip hat zahlreiche Phänotypen. Es spielt eine Rolle bei der intrazellulären Replikation in Makrophagen und Amöben sowie während der Infektion von Meerschweinchen. Zusätzlich besitzt das membran-assoziierte Protein eine PPIase-Aktivität und ist in der Lage an Kollagen IV zu binden. Außerdem ist es wichtig für die Transmigration von Legionellen über eine *in vitro* Lungen-Epithel-Barriere (Fischer *et al.*, 1992; Cianciotto und Fields, 1992; Wintermeyer *et al.*, 1995; Helbig *et al.*, 2001; Köhler *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 2007). Im Rahmen dieser Arbeit konnten weitere Phänotypen mit Mip in Verbindung gebracht werden. Mip ist beispielsweise wichtig für das Wachstum bei extremen Temperaturen und für die Sliding Motility der Legionellen. Außerdem spielt es eine Rolle bei der Sekretion von Proteinen und beim intrazellulären Trafficking und der daraus resultierenden Inhibition der phagolysosomalen Fusion. Mip ist also ein Protein, das eine ganze Reihe von Phänotypen aus unterschiedlichsten Bereichen beeinflusst. Gerade wegen der großen Bandbreite stellt sich die Frage, ob alle diese Phänotypen direkt vom Mip-Protein ausgelöst werden, oder ob Mip die Rolle eines zentralen Regulators einnimmt, der in der Lage ist, andere Virulenzfaktoren zu beeinflussen.

6.1.1 Mip beeinflusst Proteine des Sekretoms, die für die Replikation und Verbreitung in humanem Lungengewebe wichtig sind

Für die Analyse der Rolle von Mip während der *in vivo* Infektion wurden in der Vergangenheit Meerschweinchen infiziert, da diese Krankheitssymptome entwickeln, die denen des Menschen ähnlich sind. Es konnte gezeigt werden, dass der Wildtyp eine Bronchiopneumonie mit verstärkter Neutrophilen-Einwanderung im alveolaren Parenchym auslöst. Außerdem wurde eine bakterielle Ausbreitung zur Milz, begleitet von einer erhöhten Anzahl Granulozyten in der Milz, beobachtet. Bei Meerschweinchen, die mit der Mip-defizienten Mutante infiziert wurden, zeigte die

Lunge fast keine Entzündungsmerkmale und die Milz blieb unbeeinflusst. Die Detektion der Bakterien im Gewebe war nur beim Mip-positiven Stamm möglich. Diese Studien zeigen, dass die effektive Verbreitung im Lungengewebe Mip-abhängig ist. Der bakteriellen Transmigration über das alveolare Septum liegt die Durchquerung der extrazellulären Matrix zugrunde. Deshalb wurden typische ECM-Proteine auf ihre Bindung an Mip getestet. Dabei stellte sich heraus dass Kollagene, insbesondere Kollagen IV, an Mip binden. Weil Mip-defiziente Bakterien nicht in die Milz gelangen können, wurde anschließend der Einfluss von Mip auf die Transmigration durch die *in vitro* NCI-H292/ECM Barriere untersucht. So konnte gezeigt werden, dass die Durchquerung dieser Barriere Mip-abhängig war. Um die Rolle von Mip während der Transmigration genauer zu untersuchen, wurde der Abbau von metabolisch markierter ECM gemessen. Der Wildtyp war in der Lage, die ECM zu zerstören, während weder Mip-defiziente Bakterien, noch rekombinantes Mip einen Einfluss hatten. Dies zeigte, dass Mip die ECM nicht durch eine eigene proteolytische Aktivität abbauen kann. Dies bedeutet, dass andere Mip-abhängige Proteine diesen Schaden hervorrufen. Die Hemmung der PPIase-Aktivität durch FK506 oder Rapamycin zeigte, dass die PPIase-Aktivität für die Proteolyse benötigt wird (Wagner *et al.*, 2007). Es kann also vermutet werden, dass die PPIase-Aktivität des Mip-Proteins andere Proteine beeinflusst. Insgesamt kann also gesagt werden, dass Mip an Kollagen IV der Lunge bindet, dabei direkt oder indirekt ein Protein aktiviert. Dies führt zur Perforation der Epithelbarriere, was eine Verbreitung von *L. pneumophila* bis zur Milz möglich macht.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass Mip andere Proteine beeinflusst. Die Infektion von HLTEs mit Mip-defizienten Mutanten hatte eine verminderte Schädigung des Lungengewebes im Vergleich zum Mip-positiven Stamm zur Folge. Wurden die HLTEs allerdings mit rekombinantem Mip inkubiert, war kein Schaden zu beobachten. Mip alleine ist also nicht in der Lage, Lungengewebe zu schädigen. Dies führt zu der Annahme, dass Mip stattdessen andere Proteine reguliert oder aktiviert, die in der Lage sind, Gewebe zu zersetzen. Wie schon beschrieben, kam es durch die Infektion mit dem Wildtyp zu einer Disruption der alveolaren Septen, zur Ablösung des alveolaren Epithels von der Basallamina und zur Ansammlung von Protein-Exsudat. Die Bakterien ko-lokalisierten mit den beschädigten Teilen der alveolaren Septen. Deshalb wurde vermutet, dass *L. pneumophila* in der Lage ist, Gewebearrieren abzubauen. Es wurde postuliert, dass dieser Abbau wahrscheinlich durch destruktive

Enzyme, die entweder auf der Oberfläche der Bakterien lokalisiert sind, oder sich im Sekretom befinden, hervorgerufen wird. Aber auch der Induktion von destruktiven Wirtsmolekülen wird eine Beteiligung an der Gewebeerstörung nachgesagt (Jäger, Marwitz, *et al.*, 2014). Hierbei könnte es sich um Mip-abhängige Faktoren handeln. Um diese Hypothese weiter zu festigen, wurde im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss des *Legionella*-Sekretoms auf die Mip-abhängige Infektion untersucht. Um zu überprüfen, ob die Mip-Abhängigkeit des Sekretoms einen Einfluss auf den Gewebeschaden hat, wurden HLTEs mit beiden Sekretomen inkubiert. Interessanterweise konnte nur das Sekretom des Wildtyps das HLTE-Gewebe schädigen. Dieses Ergebnis ist ein weiterer Beweis dafür, dass Mip ein oder mehrere Proteine des Sekretoms aktiviert oder beeinflusst, welche in der Lage sind Gewebeschaden zu verursachen.

Ein weiterer interessanter Aspekt ist die Lokalisierung der *mip*-Deletionsmutante in HLTEs. Es wurde beobachtet, dass diese im Vergleich zum Wildtyp vermehrt in den Makrophagen nachzuweisen ist, jedoch kaum an die alveolare Auskleidung, bestehend aus Epithelzellen und Basallamina, binden. Wahrscheinlich können Legionellen mit Hilfe des Mip-Proteins an das Kollagen IV der Basallamina binden. Das Fehlen von Mip, wirkt sich vermutlich negativ auf das Anheften an der alveolaren Auskleidung und somit auf die Verbreitung innerhalb der Lunge aus. Wagner *et. al* zeigten die Wichtigkeit von Mip und seiner PPIase-Aktivität für das Durchbrechen der Lungen-Epithelbarriere und die daraus resultierende Verbreitung bis hin zur Milz. Dieser Mechanismus könnte durch ein Zusammenspiel der Kollagen-bedingten Adhärenz an die Basallamina und den Einfluss von Mip auf Gewebe-zerstörende Proteine sein.

Eine weitere wichtige Beobachtung ist die verminderte Replikation der *mip*-Deletionsmutante in HLTEs. Da sich die Legionellen im HLTEs vorrangig in Makrophagen vermehren, ist der Replikationsnachteil vermutlich auf den gleichen Mechanismus wie in Makrophagen zurückzuführen (Jäger, Marwitz, *et al.*, 2014). In *D. discoideum* konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die *mip*-Deletionsmutante-enthaltenden LCVs vermehrt mit dem Lysosom ko-lokalisieren. Mip spielt also eine Rolle beim intrazellulären Trafficking. Dies ist auch in Makrophagen der Fall, wie die ersten durchgeführten Ko-Lokalisationsexperimente zeigten (Daten nicht gezeigt). Die verminderte intrazelluläre Replikation scheint also mit einem Mip-abhängigen Defekt im intrazellulären Trafficking einherzugehen. Auch hier ist es wahrscheinlich, dass Mip selber keine direkte Rolle bei der Regulation der Inhibition

der phagolysosomalen Fusion spielt. Mip könnte Faktoren beeinflussen, die diesen Prozess steuern. Um zu überprüfen, ob das Mip-abhängige *Legionella*-Sekretom auch einen Einfluss auf die intrazelluläre Replikation hat, wurden Makrophageninfektionen unter Zugabe der Sekretome des Wildtyps und der *mip*-Deletionsmutante durchgeführt. Nach 48 h konnte die effiziente intrazelluläre Replikation des Mip-negativen Stammes mit Hilfe beider Sekretome wiederhergestellt werden. Die Vermehrung des Wildtyps wurde dagegen nicht beeinflusst. Interessant ist, dass beide Sekretome einen komplementierenden Effekt auf die *mip*-Deletionsmutante haben. Diese Ergebnisse implizieren zunächst, dass es keinen Unterschied zwischen dem Mip-abhängigen Sekretom und dem Wildtyp-Sekretom gibt, sondern dieser Effekt durch die Akkumulation der Proteine des Sekretoms hervorgerufen wird. Die Komplementation durch beide Sekretome könnte dabei eine Art Dosis-abhängiger Effekt sein. Wäre dies der Fall, würde durch die Reduzierung der Sekretomkonzentration während der Infektion ein Unterschied bei der Replikation der *mip*-Deletionsmutante unter Zugabe von WT- und Δmip -Sekretom zu erwarten sein. Trotz der Verminderung der Sekretomkonzentration bis hin zu 0,00004 $\mu\text{g/ml}$, war aber kein Unterschied zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Ein konzentrationsabhängiger Effekt ist also auszuschließen. Ein weiterer Interpretationsansatz ist, dass es durch die Zugabe von Sekretom zur Schwächung der Makrophagen kommt, was den Mip-defizienten Legionellen bei der intrazellulären Replikation einen Vorteil verschaffen würde. Dies würde aber auch mit einer Verbesserung der intrazellulären Replikation beim WT mit Sekretomzusatz einhergehen, was nicht zutrifft. Der Wildtyp hat also vermutlich nach 48 h die maximale Bakterienzahl im System Makrophagen erreicht, und es ist keine weitere Steigerung mehr möglich. Ein Hinweis für die Richtigkeit dieser Theorie ist, dass der Komplementations-Effekt generell erst nach 48 h eintritt. Nach zwei Tagen ist das zeitliche Limit dieses Infektionsmodells erreicht, da danach keine weitere Replikation mehr stattfindet.

6.1.2 Mip beeinflusst das Sekretom von *L. pneumophila*

L. pneumophila sezerniert viele Faktoren über das T2SS. Es wurden mehrere Enzymtypen beobachtet, darunter proteolytische Enzyme, lipolytische Enzyme,

Chitinasen, Phosphatasen und potenzielle Zellulasen (Cianciotto, 2005). In manchen Fällen sind die T2SS-abhängigen Effektoren eng verwandt mit den sezernierten Proteinen anderer Bakterien. ProA ist beispielsweise homolog zu der *Pseudomonas* Elastase (Aragon *et al.*, 2002). Das T2SS sezerniert aber auch Effektoren, die große Ähnlichkeiten zu eukaryotischen Proteinen haben, wie Map, ein Kollagen-ähnliches Protein und eine Eukaryoten-ähnliche Proteinase (Aragon *et al.*, 2001; Debroy *et al.*, 2006). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch Mip über das T2SS sezerniert wird. Die Translokation über die innere Membran findet vermutlich ungefalteter über das Sec-System statt.

Schon in der Vergangenheit wurden Zusammenhänge zwischen Mip und der Entfaltung der Aktivität des Sekretoms hergestellt (Debroy *et al.*, 2006). Im Überstand einer T2SS-Mutante wurde eine verminderte Hydrolyse von *p*-Nitrophenol Phosphorylcholin (*p*-NPPC) beobachtet, die in vielen Bakterien mit der Phospholipase C (Plc) in Verbindung steht (Terada *et al.*, 1999; Merino *et al.*, 1999). Weil aber bei der *plcA*-Deletionsmutante die sezernierte *p*-NPPC-Hydrolaseaktivität nur teilweise vermindert war, wurde vermutet, dass *L. pneumophila* noch eine andere Phospholipase C sezerniert (Aragon *et al.*, 2002; Cianciotto, 2005). Später wurden neben PlcA die Phospholipasen PlcB und PlcC im Sekretom von *L. pneumophila* identifiziert. Bei allen Phospholipasen wurde eine Aktivität nachgewiesen. Im Infektionsmodell *Galleria mellonella* löste eine Tripelmutante eine geringe Wirtsletalität aus. Dieser Effekt konnte jedoch bei Einzel- und Doppelmutanten nicht beobachtet werden. Dies zeigt die Relevanz von Phospholipasen für die Virulenz von Legionellen und deutet gleichzeitig auf einen kompensatorischen Effekt untereinander hin (Aurass *et al.*, 2013). Bei einem Screening zur Identifizierung von zusätzlichen Faktoren, die die sezernierte Hydrolaseaktivität fördern, wurde eine Mip-Mutante isoliert (Debroy *et al.*, 2006). Fünf unabhängig veränderte Mutanten zeigten eine 40-70 % Reduktion bei der sezernierten Aktivität und die Defekte konnten auf Proteinebene komplementiert werden. Folglich fördert Mip die *p*-NPPC-Hydrolaseaktivität in Kulturüberständen. Mit der Analyse von Überständen konnte zudem gezeigt werden, dass die Mip-abhängige Hydrolaseaktivität T2SS-abhängig ist, aber unabhängig von PlcA, was darauf hinweist, dass Mip ein anderes Exoprotein beeinflusst (Debroy *et al.*, 2006). Interessanterweise konnte mit Hilfe der Sekretomstudien dieser Arbeit gezeigt werden, dass im Sekretom des *L. pneumophila* Wildtyps PlcB (LpC_0870) akkumuliert vorliegt. Da Mip die Anwesenheit von PlcB

fördert und diese Phospholipase C einen Einfluss auf die Hydrolaseaktivität im Sekretom hat, ist PlcB vermutlich das bisher fehlende Bindeglied zwischen Mip und der Hydrolaseaktivität.

Insgesamt lagen bei den Sekretomanalysen mehr Proteine im Sekretom der *mip*-Deletionsmutante akkumuliert vor, als im Wildtyp. Unter den identifizierten Proteinen befanden sich auch zahlreiche Proteine, bei denen keine Signalsequenz vorhergesagt wurde. Hierbei könnte zunächst vermutet werden, dass sich Mip auf die Stabilität der Zellmembran auswirkt und die *mip*-Deletionsmutante deshalb durchlässiger ist als der Wildtyp. Dagegen spricht jedoch, dass die Kontrollexperimente keine erhöhte Lyse der *Δmip*-Bakterienzellen zeigten und dass nur bestimmte intrazelluläre Proteine akkumuliert waren. Außerdem wurden auch im Überstand des Wildtyps Proteine ohne vorhergesagte Signalsequenz identifiziert. Zudem gibt es zahlreiche Proteine, bei denen zwar keine Signalsequenz gefunden wurde, die aber dennoch im Sekretom nachgewiesen werden konnten. Ein Beispiel für *L. pneumophila* ist die PPIase PpiB, bei der vermutet wurde, dass sie über ein bisher unbekanntes Sekretionssystem sezerniert wird, da die Sekretion über alle bekannten Systeme ausgeschlossen werden konnte (Söderberg und Cianciotto, 2008). Ein weiteres Beispiel ist die Enolase. In vielen Bakterienspezies, wie z.B. *Leptospira interrogans*, *Streptococcus pneumoniae* und *Bacillus subtilis*, wird die Enolase trotz nicht gefundener Signalsequenz immer wieder im Überstand nachgewiesen und zählt deshalb zu den sezernierten Proteinen (Nogueira *et al.*, 2013; Bergmann *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2014). Auch bei den Sekretomstudien dieser Arbeit wurde die Enolase akkumuliert im Überstand der *mip*-Deletionsmutante nachgewiesen.

Zu den vermehrt im *Δmip*-Sekretom nachgewiesenen Proteinen zählen auch extrazelluläre Peptidasen wie das Zink-Metalloprotein (LpC_0267) und die Aminopeptidase (LpC_3100). Proteaseaktivitätsstudien zeigten jedoch keine vermehrte Proteaseaktivität im Überstand der *mip*-Deletionsmutante (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren wurden viele uncharakterisierte Proteine wie LpC_2560 und LpC_0801 identifiziert, die im Rahmen dieser Arbeit analysiert wurden.

6.1.3 LpC_2560 ist ein neuer Mip-abhängiger Virulenzfaktor von *L. pneumophila*

Die Virulenz von *L. pneumophila* beruht auf einem Zusammenspiel zahlreicher Faktoren. Fehlt einer dieser Virulenzfaktoren, kann dies sofortige Einbußen im Ausmaß der Virulenz zur Folge haben. Diese Eigenschaft ist die Grundlage für die Entwicklung neuer Wirkstoffe. Werden die Funktionen und Regulationskreisläufe von Pathogenen verstanden, können sie gezielt außer Kraft gesetzt werden. Deshalb sind die Identifizierung und Charakterisierung neuer und bereits bekannter Virulenzfaktoren und ihre Regulatoren von großer Wichtigkeit.

LpC_2560 ist ein im Sekretom lokalisiertes Protein von *L. pneumophila*. Es liegt akkumuliert im Überstand der Mip-Mutante vor, was eine Mip-Abhängigkeit des Proteins zeigt. Bisher gibt es keine Studien zur Charakterisierung von LpC_2560. Im Rahmen dieser Arbeit wurden eine Deletionsmutante und eine Komplementante hergestellt, um eine nähere Charakterisierung durchführen zu können. Infektionsstudien mit *A. castellanii* zeigten, dass sich der LpC_2560-negative Stamm schlechter intrazellulär vermehren kann als der Wildtyp. Unter Berücksichtigung, dass die Komplementationeffizienz in *L. pneumophila* nicht so hoch und im Wirtssystem *A. castellanii* zusätzlich schwierig ist, konnte die effiziente Replikation der *lpC_2560*-Deletionsmutante entsprechend wiederhergestellt werden. Interessant ist, dass *Δ2560* ähnliche Replikationsphänotypen zeigt, wie *Δmip*. Neben der Replikation in einem Wirt aus der Umwelt, wurde auch die Vermehrung in THP-1-Makrophagen untersucht. Auch hier zeigte die *lpC_2560*-Deletionsmutante einen replikationsgeschwächten Phänotyp, der der Mip-Mutante ähnelte. Auch die Komplementation in Makrophagen war verhältnismäßig erfolgreich. Da sich Legionellen in Lungengewebe vor allem in den alveolaren Makrophagen vermehren und das explantierte Lungengewebe die größte mögliche Ähnlichkeit zur Infektion im Menschen darstellt, wurde das Replikationsverhalten der Mutante auch in diesem System charakterisiert (Jäger, Marwitz, *et al.*, 2014). Wie schon in den THP-1-Makrophagen gezeigt, hat die LpC_2560-defiziente Mutante auch in HLTEs einen Replikationsdefekt. Eine Komplementation in diesem System ist bisher für keine Mutante geglückt. Der Grund hierfür könnte sein, dass das Chloramphenicol nicht alle Stellen des Lungenstücks erreicht und die Legionellen deshalb ihr Komplementations-Plasmid verlieren. Insgesamt konnte durch die Infektionsstudien gezeigt werden, dass LpC_2560 ein

Wirtssystem übergreifender Virulenzfaktor ist. Durch die Deletion dieses Faktors ist sowohl die intrazelluläre Replikation in Wirtszellen aus der Umwelt als auch aus dem Menschen geschwächt. Damit konnte im Rahmen dieser Arbeit ein neuer Virulenzfaktor für *L. pneumophila* Corby identifiziert werden.

Weiterführende Experimente zeigten, dass LpC_2560 keinen Einfluss auf das Wachstum bei extremen Temperaturen und auf die Sliding Motility von Legionellen hat (Daten nicht gezeigt). Dies spricht dafür, dass LpC_2560 ein Replikations-spezifischer Virulenzfaktor ist. Außer der im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Phänotypen ist nicht viel über dieses Protein bekannt. Es wurde aufgrund von Sequenzhomologien als *opacity protein-like surface antigen* annotiert.

Opacity-Proteine wurden bisher nur in Neisserien charakterisiert. Sie wurden entdeckt, weil deren Expression zu einer Änderung in der opaken Kolonieförmigkeit und -farbe führte (Dehio *et al.*, 1998). Die Opacity-Proteine sind integrale Außenmembranproteine, die aus acht antiparallelen β -Faltblättern bestehen. Die β -Faltblätter bilden eine Fass-Struktur, lokalisiert in der äußeren Membran, verbunden durch vier extrazelluläre Schleifen (Hauck und Meyer, 2003; Sadarangani *et al.*, 2011). In *Neisseria gonorrhoeae* (Gonokokken) wurde das Opacity-Protein Opa (*opacity-associated adhesion protein*) identifiziert (Hauck und Meyer, 2003). Im Genom der Gonokokken befinden sich insgesamt 12 Kopien des *opa*-Gens, welche unabhängig voneinander an- und ausgeschaltet werden können. Jede Kopie unterscheidet sich in den hypervariablen Regionen komplett von den anderen (Stern *et al.*, 1986; Muralidharan *et al.*, 1987; Kupsch *et al.*, 1993). Während der Infektion unterliegen Opa-Proteine einer rapiden Phasenvariation. Dies ermöglicht den Gonokokken eine funktionelle Adaptation, was das Eindringen in Wirtszellen möglich macht (Weel *et al.*, 1991). Opa-Proteine werden nicht für die initiale Kolonisierung des Wirts benötigt. Die Inokulierung von männlichen Freiwilligen mit einem Stamm, der kein Opa exprimiert, führte trotzdem zu einer erfolgreichen Kolonisierung. Alle aus diesen Freiwilligen reisolierten Bakterien exprimierten dagegen wieder Opa. Dies lässt auf einen starken Selektionsdruck in Bezug auf die Opa-Expression *in vivo* schließen (Jerse *et al.*, 1994). Mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnte gezeigt werden, dass OpaABCD für einen mukosalen Schaden bei Eileitergewebe von 14 verschiedenen Patienten verantwortlich sind. Die mukosale Schädigung beinhaltete die Verkürzung und Reduzierung der Mikrovilli auf nicht-bewimperten Zellen und die Invagination und

Abstoßung von bewimperten Zellen (Dekker *et al.*, 1990). Opacity-Proteine spielen außerdem eine Rolle in der frühen Phase der Neisserien-Infektion. Sie sind wichtig für die Adhäsion an Wirtszellen und befähigen die Bakterien dazu, Epithelzellen zu invadieren und der angeborenen Wirtsantwort zu entkommen (Meyer, 1991; Jerse und Rest, 1997). Auch bei den Nasopharynx besiedelnden Bakterium *N. meningitidis* (Meningokokken), wurden Opa-ähnliche Proteine nachgewiesen (Toleman *et al.*, 2001). Im Genom der Meningokokken sind drei bis vier Kopien des *opa*-Gens zu finden, welche ähnliche Phänotypen zu den Opa-Proteinen aus Gonokokken zeigen (Virji *et al.*, 1993; Hauck und Meyer, 2003).

Das als *opacity protein-like surface antigen* annotierte LpC_2560 hat jedoch keine Gemeinsamkeiten mit den Opa-Proteinen aus Neisserien. Der erste große Unterschied ist die Lokalisation des Proteins. Während Opa ein integrales Außenmembranprotein ist, wird LpC_2560 in den Überstand sezerniert. Als sezerniertes Protein, welches in Infektionsstudien nur einen Effekt auf die intrazelluläre Replikation zeigte, ist LpC_2560 nicht an den initialen Schritten der Infektion beteiligt. Opa ist dagegen ein wichtiger Faktor für die Adhäsion und Invasion, zeigt jedoch keinen Effekt bei der Replikation. Ein weiterer entscheidender Unterschied ist das Vorkommen des *LpC_2560*-Gens im Genom der Legionellen. Laut BLAST-Analyse ist dieses Gen nur einmal im Genom vorhanden, wohingegen in Gonokokken Opa zwölfmal gefunden wurde. In *L. pneumophila* Corby ist das Gen mit der größten Ähnlichkeit zu LpC_2560 eine nicht-ribosomale Peptidsynthase mit einem Gleichheitswert von 47 %. Der *E-value* liegt allerdings bei 5,3, was die Ähnlichkeit der Proteine relativiert. Eine weitere, wichtige Unterscheidung ist die Kolonieform. Während Opa-negative Stämme veränderte Kolonieformen und -farben aufweisen, unterscheidet sich *LpC_2560* morphologisch nicht vom Wildtyp.

Alle genannten Unterschiede und die fehlenden Gemeinsamkeiten zwischen den Proteinen weisen darauf hin, dass LpC_2560 kein Opacity-Protein ist und somit falsch annotiert wurde. Die Charakterisierung von LpC_2560 im Rahmen dieser Arbeit ergab, dass es sich um einen neuen, Replikations-spezifischen Virulenzfaktor handelt, der Mip-abhängig sezerniert wird. Deshalb wird als neuer Name Mrf (*Mip-dependent replication factor*) vorgeschlagen.

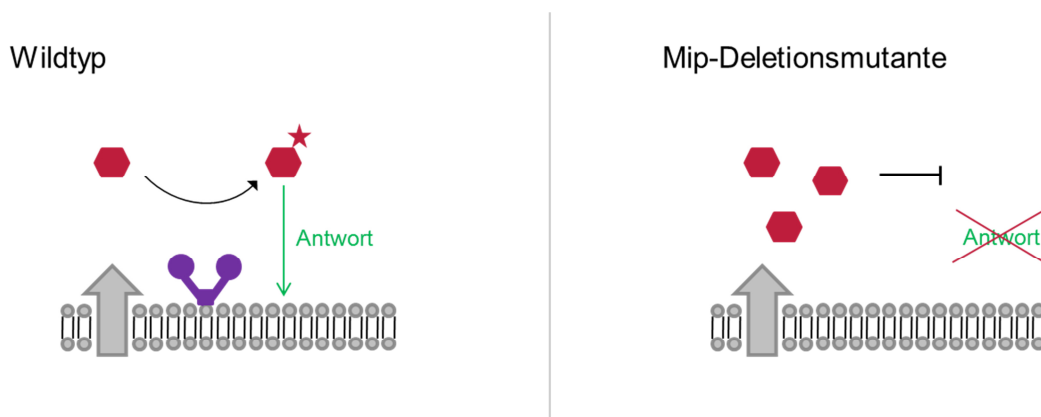


Abbildung 77: Schematische Darstellung der Mip-Aktivierungshypothese. Die sezernierten Mip-abhängigen Proteine, werden im Wildtyp von Mip aktiviert. Da die Proteine so funktionsfähig sind, erhält die Zelle eine Antwort, wie z.B. ein Stoffwechselprodukt, oder ein Protein einer Regulationskaskade. Die Zelle erkennt, dass der Sollwert erreicht wurde. Fehlt aber das Mip-Protein, werden die Proteine nicht mehr, oder nur bedingt durch einen kompensatorischen Effekt von anderen PPIasen, aktiviert. Die Zelle erhält keine Antwort, weil beispielsweise Regulationsprozesse gestört werden. Es kommt zur vermehrten Sekretion des Mip-abhängigen Proteins, um den Sollwert wieder erreichen zu können. Dies kann jedoch nicht passieren, da das Mip-Protein fehlt. Deshalb hat die *mip*-Deletionsmutante dennoch Defekte in diversen Bereichen.

Interessant ist die Frage, warum die *mip*-Deletionsmutante vermehrt einen Virulenzfaktor sezerniert, der eine ähnliche Bedeutung für die intrazelluläre Replikation zu haben scheint wie das Mip-Protein. Trotz der vermehrten Sekretion von Mrf zeigt die *mip*-Deletionsmutante letztendlich trotzdem eine schlechtere Replikation im Wirt. Deshalb lässt sich vermuten, dass Mrf ohne die Anwesenheit von Mip zwar gebildet und sezerniert wird, aber weniger aktiv ist. Da Mip insgesamt keine direkte Rolle bei Virulenzprozessen zu spielen scheint, ist es möglich, dass Mrf von Mip beeinflusst wird. Denkbar wäre zum Beispiel eine Aktivierung des Proteins durch die Mip-abhängige Katalyse der Isomerisierung von prolinhaltigen-Regionen. Wäre Mip dafür verantwortlich, sezernierte Proteine zu aktivieren, könnte damit die Akkumulation zahlreicher Proteine im Überstand der *mip*-Deletionsmutante erklärt werden. Die vom Wildtyp sezernierten Mip-abhängigen Proteine, würden dann von Mip aktiviert werden. Da die Proteine so ihre Funktion ausüben können, erhält die Zelle eine Art Antwort. Dies könnte zum Beispiel ein Stoffwechselprodukt sein, oder ein Protein einer Regulationskaskade. Die Zelle würde also erkennen, dass der Sollwert erreicht wurde.

Fehlt aber das Mip-Protein, würden die Proteine nicht mehr, oder nur bedingt durch einen kompensatorischen Effekt von anderen PPIasen, aktiviert werden. Da die Zelle dann keine Antwort mehr erhalten würde, weil beispielsweise Regulationsprozesse gestört werden, würde dieses Protein vermehrt sezerniert werden. Der Sollwert könnte aber nicht erreicht werden, da das Mip-Protein nicht vorhanden ist. Deshalb würden im Endeffekt die Mip-abhängigen Proteine zwar akkumuliert vorliegen, die *mip*-Deletionsmutante hat aber wegen der fehlenden Aktivität dieser Proteine dennoch Nachteile in Bereichen wie der intrazellulären Replikation.

Zeitgleich mit Mrf wurde das hypothetische Protein LpC_0801 auf seine Rolle bei der intrazellulären Replikation in verschiedenen Wirtssystemen untersucht. Dieses Protein wurde im Rahmen der Sekretionsanalysen nur im Überstand der *mip*-Deletionsmutante, aber nicht im Wildtyp-Sekretom nachgewiesen. Literaturrecherchen brachten keine Hinweise auf die Funktion des Proteins. Die durchgeführten Infektionsversuche zeigten, dass LpC_0801 keinen Einfluss auf die intrazelluläre Replikation in *A. castellanii*, THP-1-Makrophagen und HLTEs hat. Außerdem spielt es auch keine Rolle bei der Sliding Motility und beim Wachstum bei extremen Temperaturen (Daten nicht gezeigt). Der einzig bekannte Phänotyp ist also, dass LpC_0801 im Sekretom nachgewiesen werden kann, wenn das Mip-Protein deletiert ist. Es könnte sein, dass LpC_0801 im Wildtyp mit der Membran assoziiert ist. Wenn die Bindung an die Membran nicht mehr zustande kommt, weil Mip nicht mehr vorhanden ist, könnte das beispielsweise an einer Missfaltung oder einem Strukturverlust liegen. LpC_0801 ist ein sehr prolinreiches Protein, was die Faltung generell erschwert. PPIasen, wie Mip, sind dagegen in der Lage Peptidbindungen nach Prolinen zu isomerisieren und Proteine so bei der Faltung zu unterstützen (Ünal und Steinert, 2014). Insgesamt konnte LpC_0801 im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter charakterisiert werden. Nach bisherigem Stand zählt dieses Protein nicht zu den Virulenzfaktoren von *L. pneumophila*.

6.2 PPIasen sind wichtig für Temperaturwachstum, Motilität und intrazelluläre Replikation und kompensieren sich gegenseitig

Obwohl Peptidbindungen energetisch das *trans*-Konformer bevorzugen, haben Peptidylprolyl-Bindungen wegen der einzigartigen Struktur des Prolins keine klare Präferenz. Dies hat eine 100-fache Reduktion der Proteinfaltung und Denaturierung zur Folge. PPIasen sind in der Lage die Faltung von Proteinen durch die Katalyse der *cis/trans* Isomerisierung von Peptidylprolyl-Bindungen zu unterstützen. Neben der enzymatischen Aktivität werden PPIasen mit diversen zellulären Funktionen in Verbindung gebracht. Insgesamt ist die Entschlüsselung der physiologischen Rolle dieser Proteine durch ihre pleiotropen Phänotypen sehr schwierig (Rasch *et al.*, 2014).

L. pneumophila hat sechs annotierte PPIasen, darunter zwei Cyclophiline (PpiA und PpiB), zwei Parvuline (PpiD und SurA) und zwei FKBP's (TF und Mip). Mip ist die bisher am besten charakterisierte PPIase. PpiB war bisher ebenso Gegenstand wissenschaftlicher Studien, aber über die Funktion der anderen vier PPIasen kann nur anhand von Vergleichen mit homologen Proteinen anderer Bakterienspezies Rückschlüsse auf die Funktion gezogen werden.

Die optimale Temperatur für das Wachstum von *Legionella*-Stämmen liegt bei 37 °C. Beim Wachstum über 44 °C geht die Zellteilung und Respiration merklich zurück. Die Zellteilung stoppt bei einer Temperatur zwischen 48,4 °C bis 50 °C, die Legionellen behalten aber ihre metabolische Aktivität bei. Die Respiration pro Zelle steigt bis zu einer Temperatur von 45 °C und fällt anschließend parallel zur Multiplikationsrate (Kusnetsov *et al.*, 1996). Für den Fortbestand und die Vermehrung außerhalb des Temperaturoptimums, haben Bakterien verschiedene Mechanismen entwickelt. PPIasen haben dabei eine zentrale Bedeutung.

Das Cyclophilin *LpPpiA* wurde vermehrt im Wildtyp-Sekretom von Kulturen nachgewiesen, die bei 17 °C und 12 °C kultiviert wurden. Seine tatsächliche Relevanz für das Wachstum bei niedrigen Temperaturen konnte mit einer Deletionsmutante nicht bestätigt werden. Ein Grund für die fehlende Bestätigung könnte sein, dass die fehlende PPIase-Funktion von PpiA vom Cyclophilin *LpPpiB* kompensiert wird. Die PPIase *LpPpiB* liegt ebenfalls akkumuliert im Sekretom von Kulturen vor, die bei 12 °C und 17 °C kultiviert wurden und die isogenische Deletionsmutante zeigte einen

Wachstumsnachteil in Flüssigkultur bei niedrigen Temperaturen (Söderberg und Cianciotto, 2008). Auch die PPIase PpiB von *Bacillus subtilis*, mit einer Sequenzhomologie von 38 % zu *LpPpiB*, spielt eine Rolle bei der Kälte-Adaptation des Bakteriums (Graumann *et al.*, 1996). Die Transkription der PPIase PpiD von *E. coli* wird dagegen unter Hitzeschock-Bedingungen induziert. Die Deletion von *EcPpiD* hat dagegen die Hochregulation von der σ^E -abhängigen Stressantwort, ausgelöst durch die Akkumulation von missgefalteten Proteinen im Periplasma, zur Folge. Dies zeigt, dass die Chaperon-Aktivität von *EcPpiD* für die korrekte Faltung für einige sezernierte Proteine wichtig ist (Dartigalongue und Raina, 1998).

Insgesamt wird klar, dass PPIasen für die Toleranz verschiedener Bakterienspezies gegenüber extremen Temperaturen von Bedeutung sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein möglicher Einfluss von der PPIase Mip auf das Wachstum von *L. pneumophila* bei extremen Temperaturen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die *mip*-Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp einen Wachstumsnachteil sowohl bei 17 °C als auch bei 44 °C zeigt. Parallel dazu wurden eine *ppiB*-Deletionsmutante und der Stamm $\Delta mip \Delta ppiB$ getestet. Wie schon publiziert wächst $\Delta ppiB$ schlechter bei 17 °C. Aber auch bei 44 °C ist ein Wachstumsnachteil zu beobachten. Das Wachstum der Doppelmutante bei extremen Temperaturen ist im Vergleich zu den Einzelmutanten am stärksten eingeschränkt. Diese Ergebnisse zeigen zum einen, dass *LpMip* als weitere PPIase eine Rolle für das Wachstum außerhalb des Temperaturoptimums spielt. Zum anderen wird deutlich, dass Mip und PpiB ähnliche Phänotypen haben. Da das Fehlen beider Proteine zu einer stärkeren Ausprägung des Phänotyps führen, ist es wahrscheinlich, dass die beiden PPIasen sich gegenseitig bis zu einem gewissen Grad kompensieren können. Da verschiedene PPIasen eine Rolle beim Wachstum bei extremen Temperaturen spielen, sind diese vermutlich nicht direkt bei diesem Prozess involviert sondern beeinflussen relevante Proteine, beispielsweise durch Faltung oder Aktivierung, wie es auch schon für *EcPpiD* postuliert wurde (Dartigalongue und Raina, 1998). Gerade bei Temperaturen außerhalb des Optimums ist die Proteinfaltung oft schwierig (Ünal und Steinert, 2014). Deshalb ist die Katalyse der Isomerisierung und Faltung von Proteinen durch PPIasen und Chaperone wichtig, um Stoffwechselprozesse zu stabilisieren, indem die Rate der fehlgefalteten, inaktiven Proteine niedrig gehalten wird.

Ein weiterer wichtiger Aspekt für die Kolonisierung und das Überleben von Bakterien in unterschiedlichen Habitaten ist die Motilität der Bakterien. Auch hier spielen PPIasen eine Rolle. Das Parvulin PrsA2 fördert beispielsweise die Swimming Motility von *Listeria monocytogenes* (Zemansky *et al.*, 2009). Auch das Mip-like Protein in *Burkholderia pseudomallei* spielt eine Rolle bei der Swarming Motility des Bakteriums (Norville *et al.*, 2011). Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Verhalten der Mip- und PpiB-Einzelmutanten und der Doppelmutante auf die Sliding Motility von *L. pneumophila* untersucht. Sliding Motility ist eine ganz besondere Art der Fortbewegung. Diese liegt der Sekretion eines Tensidfilms durch das Zusammenspiel von T1SS und T2SS zugrunde. Durch den Tensidfilm ändert sich die Oberflächenspannung auf der BCYE-Agarplatte, was das Ausschwärmen der Legionellen begünstigt. Sowohl die Mip-Mutante als auch die PpiB-Mutante bilden über die Zeit von 21 Tagen kleinere Kolonie- und Tensidfilmflächen aus, als der Wildtyp. Auch in diesem Fall zeigt die Doppelmutante wieder den am stärksten ausgeprägten Phänotyp. Die PPIasen Mip und PpiB sind also direkt oder eher indirekt an der Sekretion der Tenside beteiligt. Auch bei der Sliding Motility ist ein kompensatorischer Effekt zwischen der PPIase-Aktivität von Mip und PpiB zu beobachten.

Für Mip ist bekannt, dass die Deletionsmutante eine verminderte intrazelluläre Replikation in Makrophagen und Amöben zeigt (Cianciotto *et al.*, 1989; Engleberg *et al.*, 1989; Cianciotto und Fields, 1992). Im Rahmen dieser Arbeit konnte zusätzlich eine verminderte Replikation und ein geringerer Gewebeschaden in HLTEs beobachtet werden. Somit konnte die Relevanz von Mip für die humane Infektion bestätigt werden. Über die PPIase PpiB wurde publiziert, dass diese dagegen keine Rolle bei der intrazellulären Replikation in *A. castellanii* spielt, jedoch eine etwas geringere Invasionsrate aufweist (Söderberg und Cianciotto, 2008). Im Rahmen dieser Arbeit wurde bei der Wiederholung dieses Versuchs ebenfalls beobachtet, dass die *ppiB*-Deletionsmutante sich nur leicht geringer vermehrt als der Wildtyp. Die *mip*-Deletionsmutante zeigte dagegen einen stärkeren Effekt. Interessant war jedoch, dass sich die Doppelmutante schlechter intrazellulär vermehren konnte als die *mip*-Deletionsmutante. Dies deutet darauf hin, dass PpiB doch eine Rolle bei der intrazellulären Replikation in *A. castellanii* spielt. In der *ppiB*-Deletionsmutante scheint dieser Defekt durch die PPIase Mip kompensiert werden zu können und auch PpiB hat

wahrscheinlich eine leichte kompensatorische Wirkung auf Mip. Insgesamt scheint Mip für die intrazelluläre Replikation relevanter zu sein als PpiB. Die PPIase-Mutanten wurden anschließend auf ihr Replikationsverhalten in Makrophagen und HLTEs getestet. Hier zeigte sich, dass die Einzelmutanten und die Doppelmutante eine gleichermaßen verminderte Replikation zeigen. Es konnte also kein kompensatorischer Effekt in Makrophagen festgestellt werden. Dafür konnte gezeigt werden, dass PpiB bei der Replikation in Makrophagen eine Rolle spielt. In HLTEs vermehrt sich PpiB wieder nur leicht geringer als der Wildtyp und die *mip*-Deletionsmutante zeigt den gleichen Replikationsnachteil wie die Doppelmutante. Also findet auch in HLTEs keine gegenseitige Kompensation der PPIase-Aktivität von Mip und PpiB statt. Zusammenfassend ist also eine Kompensation beim natürlichen Wirt *A. castellanii* möglich, im Menschen jedoch nicht trotz der phänotypischen Redundanz von Mip und PpiB in Makrophagen. Es kann sein, dass bei der Replikation im humanen System andere PPIasen eine kompensatorische Wirkung haben.

Sowohl das Mip-Protein als auch PpiB haben phänotypische Redundanzen und können sich in fast allen Bereichen gegenseitig kompensieren. Wie für Mip bereits in dieser Arbeit postuliert, scheint auch die Virulenz des Cyclophilins PpiB durch die Beeinflussung anderer Proteine zustande zu kommen. Ein möglicher Erklärungsansatz dafür ist die gemeinsame PPIase-Funktion, welche wichtig für die Faltung und Aktivierung verschiedenster Proteine ist. Die beobachteten Phänotypen würden dann durch die Inaktivität bestimmter PPIase-abhängiger Proteine hervorgerufen werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte zudem gezeigt werden, dass die Sekretomprofile aller PPIase-Mutanten unterschiedlich sind. Dies unterstützt zusätzlich die Hypothese, dass PPIasen die Proteine des Sekretoms beeinflussen. PPIasen haben also eine zentrale Rolle in der Proteinregulation und stellen damit ein geeignetes Ziel für die Entwicklung neuer Wirkstoffe dar.

Auch in *E. coli* konnte bereits die funktionelle Redundanz von den PPIasen FkpA und SurA gezeigt werden. Die Chaperone SurA und Skp spielen eine wichtige Rolle bei der Biogenese von äußeren Membranproteinen (OMPs). Deshalb kann der Stamm *ΔsurAΔskp* bei 37 °C keine OMPs mehr ausbilden und ist somit letal. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die Doppelmutante bei 44 °C aber dennoch überlebensfähig ist. Daraufhin konnte FkpA als multicopy Suppressor für den letalen Phänotyp dieses Stammes identifiziert werden. Die im Anschluss daran generierte

ΔsurAΔfkpA war dagegen bei 37 °C überlebensfähig, aber bei 44 °C letal. Weitere *in vitro* Analysen zeigten, dass FkpA unter Hitzeschock-Bedingungen die OMP-Aggregation effizienter verhindern kann und schneller und stärker an das OMP-Substrat binden kann. Bei der temperaturabhängigen OMP-Biogenese ist bei normaler Temperatur SurA das primäre Chaperon, Skp nur mäßig wichtig und FkpA eher unwichtig. Unter Hitzeschock-Bedingungen ändert sich die Reihenfolge jedoch, sodass SurA und FkpA am wichtigsten sind und Skp eher unwichtig (Abb. 78) (Ge *et al.*, 2014).

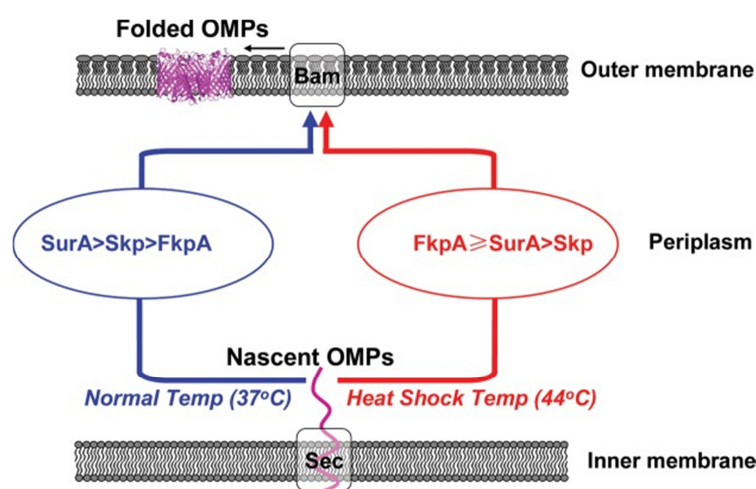


Abbildung 78: Schematische Darstellung der temperaturabhängigen, funktionellen Bedeutung der drei periplasmatischen Hauptchaperone SurA, Skp und FkpA für die OMP-Biogenese in *E. coli*: **SurA > Skp > FkpA** bei normalen Temperaturen und **FkpA ≥ SurA > Skp** bei Hitzeschock-Temperaturen. Sec ist das essentielle SecYEG-System für die OMP-Translokation über die innere Membran und Bam ist der essentielle BamABCDE-Komplex für den Zusammenbau und die Insertion von OMP in der äußeren Membran (Ge *et al.*, 2014). Diese PPIasen mit Chaperon-Aktivität sind nicht nur Bestandteil der Biogenese von OMPs, sondern kompensieren auch ihre Funktionen untereinander.

In dieser Publikation konnte gezeigt werden, dass diese PPIasen mit Chaperon-Aktivität in *E. coli* nicht nur alle Bestandteil der Biogenese von OMPs sind, sondern auch in der Lage, ihre Funktionen untereinander zu kompensieren (Ge *et al.*, 2014). Bei der Kompensation der PPIase-Funktion scheint es keine Rolle zu spielen, welcher Klasse die PPIase angehört. Mip gehört zu den FKBP's und PpiB zu den Cyclophilinen, aber dennoch ist eine Kompensation möglich. Auch bei *E. coli* gehört SurA zu den Parvulinen und FkpA zu den FKBP's, dennoch zeigen beide PPIasen eine funktionelle

Redundanz (Ge *et al.*, 2014). Die Zusammenarbeit der PPIasen bei der Katalyse von Faltungsprozessen scheint von großer Bedeutung zu sein, da viele wichtige Prozesse davon abhängig sind.

Es könnte hinterfragt werden, warum Mip an der Faltung oder Aktivierung von Proteinen beteiligt sein soll, wenn es an der äußeren Membran assoziiert ist, aber nicht im Periplasma vorkommt. Nach der Synthese werden Proteine des Sekretoms sezerniert und müssen letztendlich richtig gefaltet sein, um ihre Funktion ausüben zu können. In *Listeria monocytogenes* wurde das Protein PrsA2 beschrieben, welches ein Membran-assoziiertes Lipoprotein ist, das die Faltung und Stabilität von Proteinen unterstützt, die die bakterielle Membran durchqueren. Bei diesem Protein wurde an der N- und C-terminalen Domäne eine Chaperonfunktion und im Zentrum eine PPIase-Funktion (Parvulin) gemessen. PrsA2 spielt eine Rolle bei der Integrität der Zellwand, die Swimming Motility, die Resistenz gegen osmotischen Stress und die Virulenz und Viabilität in Wirtszellen (Cahoon und Freitag, 2014). Mip weist einige Ähnlichkeiten zu PrsA auf. Es ist ebenfalls Membran-assoziiert, hat eine PPIase-Aktivität und ist wichtig für die Sliding Motility und für die Virulenz und Viabilität in Wirtszellen. Mip ist wie PrsA2 in der Lage, Proteine des Sekretoms zu beeinflussen. Es ist also wahrscheinlich und auch sinnvoll, dass die Faltung von sezernierten Proteinen katalysiert wird. Extrazellulär ist dies aber wahrscheinlich nicht einfach, da sich PPIase und Zielprotein nach der Sekretion zunächst räumlich annähern müssen. Membran-assoziierte PPIasen wie Mip haben den Vorteil dass sie, wenn sie nahe an den Sekretionssystemen lokalisiert sind, einfach mit Zielproteinen in Kontakt kommen. Sezernierte PPIasen wie PpiB stellen vermutlich eine Ergänzung dar, um die Wahrscheinlichkeit, dass es zu einer Katalyse kommt zu erhöhen. Insgesamt wird klar, dass die *cis/trans* Isomerisierung nach Prolinen eine große Bedeutung für viele bakterielle Prozesse hat und PPIasen und Chaperone deshalb eine zentrale Rolle bei der Virulenz spielen.

Insgesamt sind PPIasen trotz ihrer indirekten Rolle bei der Virulenz von *L. pneumophila* ein höchst interessantes Target für die Entwicklung neuer Wirkstoffe. Da diese Enzymgruppe für so viele unterschiedliche Virulenzprozesse wichtig ist, könnte ein allgemeiner PPIase-Inhibitor den Pathogen nachhaltig schwächen. Ein zusätzlicher Aspekt ist, dass PPIasen nicht nur bei Legionellen, sondern auch bei zahlreichen anderen Pathogenen eine Rolle für die Virulenz spielen (Lundemose *et al.*, 1992; Leuzzi *et al.*, 2005; DebRoy *et al.*, 2010; Echenique-Rivera *et al.*, 2011). Deshalb ist es

sinnvoll, die Erforschung von PPIasen und ihrer Funktion weiter voranzutreiben, um neuartige Wirkstoffe entwickeln zu können und damit eine Alternative zu Antibiotika zu etablieren.

6.3 Cycloheximid-Derivate haben eine biologische Aktivität gegen *L. pneumophila*

Moonlighting Proteine wie *L. pneumophila* Mip erlangen durch die stetig steigende Zahl von Antibiotikaresistenzen eine immer größer werdende Bedeutung. Diese Proteine haben mehr als eine Funktion und sind oft Virulenz-assoziiert. Daher stellen sie ein interessantes Ziel für die Entwicklung neuer Wirkstoffe dar (Henderson und Martin, 2014; Rasch *et al.*, 2015). Das Ziel dieser Arbeit war es, neuartige, nicht immunsuppressive PPIase-Inhibitoren, die nicht zu den Makroliden gehören, auf ihren Einfluss auf das Wachstum und die Infektiosität von *L. pneumophila* zu testen. Mip wurde als Virulenzfaktor charakterisiert, der in der frühen Phase der Infektion von Makrophagen eine Rolle spielt (Cianciotto *et al.*, 1989; Fischer *et al.*, 1992; Cianciotto und Fields, 1992; Rasch *et al.*, 2015). Während die PPIase-Aktivität nur die Invasion von monozellulären Zellen, aber nicht die intrazelluläre Replikation beeinflusst, war eine Mip-Mutante mit einer verbleibenden PPIase-Aktivität von 2 % im Meerschweinchenmodell attenuiert (Wintermeyer *et al.*, 1995; Köhler *et al.*, 2003; Rasch *et al.*, 2015). In Bezug auf die Beobachtungen im Tiermodell wurde gezeigt, dass Mip als Moonlighting-Protein an Kollagen IV der ECM von Lungengewebe binden kann. Durch die Bindung ermöglicht Mip eine effiziente Kolonisierung und Ausbreitung der Bakterien zur Milz von infizierten Tieren zusätzlich zur Infektion von monozellulären Zellen (Wagner *et al.*, 2007; Rasch *et al.*, 2015).

Wegen der hohen strukturellen Ähnlichkeit zwischen Mip und humanen FKBP, wie FKBP12, profitiert die Entwicklung von neuartigen, Mip-spezifischen Inhibitoren von vorhandenen Strukturdaten und Computermodellierung. Bis dato wurden zwei Ansätze für das Design von Mip-spezifischen Inhibitoren publiziert. Bei dem ersten Ansatz wurde sich die Moonlighting-Eigenschaft von Mip zu Nutze gemacht, um die Bindesequenz in Kollagen IV als ein 13-mer Prolin-reiches Peptid (P290) innerhalb der NC1-Domäne zu identifizieren. Dieses Peptid wurde chemisch synthetisiert und es

wurde ein Computer-Modell der Struktur vom Mip-P290-Komplex in Anlehnung an NMR-Messungen erstellt. Durch die Voraussagen des Computermodells konnte eine zyklische Variante des P290 entworfen werden, welches in der Lage war, die Transmigration durch eine *in vitro* Epithelzellbarriere zu verringern (Ünal *et al.*, 2011; Rasch *et al.*, 2015).

Beim zweiten Ansatz wurden neuartige Pipecolinsäure-Derivate mit Rapamycin als Ausgangssubstanz synthetisiert, weil Computeranalysen der Struktur des Mip-Rapamycin Komplexes zeigten, dass der Pipecolin-Teil von Rapamycin mit der hydrophoben Stelle des aktiven Zentrums von Mip verankert ist (Ceymann *et al.*, 2008b; Juli *et al.*, 2011; Rasch *et al.*, 2015). Die daraus entstandenen Substanzen waren in der Lage die PPlase-Aktivität von Mip mit IC_{50} -Werten um die 6 μ M zu hemmen. Humane FKBP's konnten dennoch 30-fach effizienter als Mip gehemmt werden, was für eine geringe Spezifität gegenüber humanen FKBP's spricht (Juli *et al.*, 2011; Rasch *et al.*, 2015). In einer weiterführenden Studie wurden die inhibitorischen Aktivitäten dieser Derivate auch für BpML1 und Mip-ähnliche Proteine der Pathogene *Yersinia pestis* und *Francisella tularensis* bestätigt (Begley *et al.*, 2014; Rasch *et al.*, 2015).

Für die Entwicklung von neuartigen Inhibitoren mit einer steigenden Spezifität für Mip, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein neuer Ansatz gewählt, indem zwei bereits beschriebene FKBP-Inhibitoren mit Hilfe der synthetischen Chemie kombiniert wurden. Unter diesen Inhibitoren wurde Cycloheximid durch klassische Funktionsscreenings identifiziert, während Adamantan mit Hilfe von Computer-Modellierung vorhergesagt und seine Derivate experimentell validiert wurden (Babine *et al.*, 1995; Christner *et al.*, 1999; Rasch *et al.*, 2015). Eine generelle Beobachtung für die neuartigen Cycloheximid-Derivate, die im Rahmen dieser Studie verwendet wurden, war dass die Imid-substituierten Cycloheximide mit Adamantyl-Derivaten die effizienteren Inhibitoren hervorbrachten als die mit *tert*-Butylamin substituierten. Der höchste IC_{50} -Wert der ersten Gruppe (MT_30.93) liegt bei $16.3 \pm 2.6 \mu$ M und der der zweiten Gruppe (MT_30.9) bei $31.7 \pm 7.4 \mu$ M.

Für Cycloheximid-N-Ethylethanoat wurde ein IC_{50} -Wert von $6.5 \pm 1 \mu$ M gegenüber dem Mip-ähnlichen Protein BpML1 von *Burkholderia pseudomallei* beschrieben (Isobel H Norville *et al.*, 2011; Rasch *et al.*, 2015). Durch die Nutzung von Adamantyl-Derivaten als Substituenten konnten Cycloheximid-Derivate mit verbesserten IC_{50} -Werten, so niedrig wie $1.7 \pm 0.2 \mu$ M (MT_30.32), produziert werden, die humanes

FKBP12 nur noch 10-fach besser inhibieren konnten als Mip. Dies spricht für den Erfolg dieses kombinatorischen Ansatzes. Obwohl alle Substanzen außer MT_30.9 effizientere Inhibitoren gegen FKBP12 waren, konnte die Spezifität gegenüber Mip im Vergleich zu den bisher beschriebenen Pipecolinsäure-Derivaten dennoch erhöht werden. Ein Beispiel dafür ist die nur 10-fach bessere Inhibition von FKBP12 durch MT_30.32 (Rasch *et al.*, 2015).

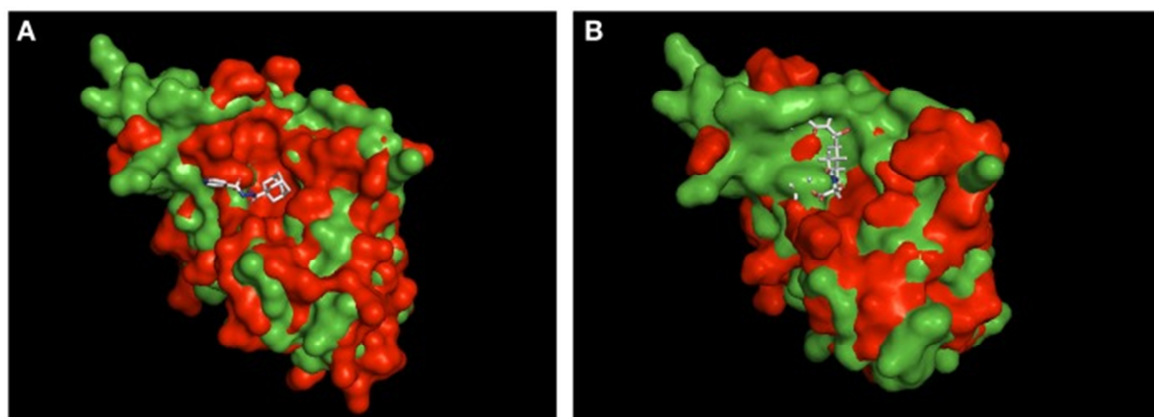


Abbildung 76: Strukturelles Alignment von Mip und bekannten PPIase-Inhibitor-Komplexen. Gezeigt sind die strukturellen Überlagerungen des Oberflächen-Modells von Mip (1FD9, grün) mit (A) dem PvFKBP35-SAR-Komplex (4MVG, rot) und (b) dem BpML1-Cycloheximid-N-Ethylethanoat-Komplex (2KO7, rot). Die Liganden wurden als Stäbchenmodell dargestellt. Die Überlappung in (A) impliziert, dass Mip und PvFKBP35 im hydrophoben Spalt, wo SAR bindet, topologisch ähnlicher sind. Daraus folgend wird eine vergleichbare Bindungsart von MT_30.32 oder MT_35.51 an Mip durch den Adamantyl-Teil vermutet. Die Überlappung in (B) bestätigt substanzielle topologische Unterschiede zwischen Mip und BpML1 in der Schleifenregion und der Nähe des hydrophoben Spalts, von dem gezeigt wurde, dass er mit Cycloheximid-N-Ethylethanoat interagiert. Daher binden die Cycloheximid-Teile von MT_30.32 und MT_30.51 sehr wahrscheinlich auf eine andere Art an Mip. Die strukturellen Überlagerungen wurden mit Hilfe von PyMOL Molecular Graphic Systems, Version 1.5.0.4 Schrödinger, LLC durchgeführt (Rasch *et al.*, 2015).

Zurzeit kann über die Art der Bindung von MT_30.32 und MT_30.51 an Mip nur spekuliert werden. Für Cycloheximid-N-Ethylethanoat wurde dagegen eine NMR-Struktur des Komplexes mit BpML1 publiziert (2KO7). Diese Struktur zeigte, dass die Cycloheximid-Derivate anders an das aktive Zentrum binden, als es für FK506 und Rapamycin bekannt ist. Cycloheximid-N-Ethylethanoat interagiert statt mit dem enzymatischen Spalt eher mit Resten in der näheren Umgebung davon und besonders mit zwei Wendungen außerhalb des Kerns (Isobel H Norville *et al.*, 2011; Rasch *et al.*,

2015). Ähnlich verhält es sich bei dem Adamantan-Derivat Supradamal im Komplex mit FKBP35 von *Plasmodium vivax* (4MGV). Hier passt der funktionale Bereich des Adamantans perfekt in den hydrophoben Spalt, wo nicht-bindende Kontakte mit vielen konservierten Aminosäuren wie Trp77 (Trp162 in Mip) entstehen, welche die Basis der PPIase-Kavität bilden (Harikishore *et al.*, 2013; Rasch *et al.*, 2015). Wenn diese beiden Strukturen als Referenz betrachtet werden und mit Mip aufeinander gelegt werden, wird klar, dass die topologischen Ähnlichkeiten zwischen den PPIase-Domänen von PvFKBP35 und Mip höher sind als die von BpML und Mip (Abb. 76) (Rasch *et al.*, 2015).

Wegen der höheren Ähnlichkeit zwischen PvFKBP35 und Mip kann geschlussfolgert werden, dass die Adamantan-Teile ähnlich an Mip binden und zwar durch das Besetzen des hydrophoben Bereichs. Im Gegensatz dazu unterscheiden sich Mip und BpML1 insbesondere in der Region der Schleife, von welcher gezeigt wurde, dass sie mit Cycloheximid-N-Ethylethanoat interagiert. Mip hat eine voluminösere Topologie an diesem Teil, was die Bindung der Cycloheximid-Inhibitoren stören kann. Für die Zukunft wäre daher eine Entschlüsselung der genauen Bindungsart von MT_30.32 oder MT_30.51 sehr interessant (Rasch *et al.*, 2015).

Nach der Feststellung, dass die neuartigen Cycloheximid-Derivate die Mip-Inhibierungskapazität durch das Erreichen niedrigerer IC₅₀-Werte und höherer Spezifität verbessert haben, wurde deren antibakterielles Potential in Wachstums- und Infektionsversuchen untersucht. Von den sieben Derivaten mit Adamantyl-Substituierungen waren vier (MT_30.32, MT_30.51, MT_30.92 und MT_30.93) in der Lage, das bakterielle Wachstum ab einer Konzentration von 30 µM zu hemmen. Von diesen vier inhibierten nur zwei (MT_30.32 und MT30.51) die bakterielle Replikation in Makrophagen, ohne zytotoxische Nebenwirkungen zu haben.

Eine interessante Beobachtung unserer Studien ist, dass die inhibitorische Wirkung der vier Adamantyl-substituierten Cycloheximid-Derivate Mip-unabhängig war. Das Wachstum der *mip*-Deletionsmutante wurde gleichermaßen durch die Inhibitoren beeinflusst, wie der Wildtyp. Dies lässt vermuten, dass es andere Wirkstoff-Ziele als Mip gibt (Rasch *et al.*, 2015). Soweit bekannt gibt es kein anderes FKBP in *L. pneumophila* außer den Ribosomen-assoziierten Trigger-Faktor (TF), welcher eine zentrale FKBP-Domäne enthält (Rasch *et al.*, 2014). Allerdings ist die PPIase-Funktion beim TF in vielen Bakterien überflüssig (Hoffmann *et al.*, 2010; Rasch *et al.*, 2015).

Deshalb ist es fraglich, ob der TF ein zusätzliches Ziel von biologisch aktiven Derivaten ist. Abgesehen davon lässt der Umstand, dass Mip keine schädliche Wirkung auf Bakterien hat, aber die Inhibitoren MT_30.32 und MT_30.52 eine inhibitorische Wirkung auf die intrazelluläre Replikation haben, lassen vermuten, dass die PPIase-Funktion durch andere PPIasen kompensiert werden kann. Ein entsprechendes Beispiel wurde aktuell für *E. coli* beschrieben, wo die Deletion des periplasmatischen Parvulins SurA und des Chaperons Skp wegen der Defekte im Aufbau von Außenmembranproteinen bei 37 °C letal sind. Unter Hitzeschock-Bedingungen hebt sich dieser Defekt jedoch durch die Hochregulation vom periplasmatischen FKBP FkpA wieder auf (Ge *et al.*, 2014; Rasch *et al.*, 2015). Außerdem wäre es für die Zukunft interessant zu testen, ob andere *Legionella*-PPIasen auch ein Ziel für MT_30.32 und MT_30.51 sind, oder ob es ein alternatives Ziel für diese Substanzen gibt. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Adamantyl-substituierten Cycloheximid-Derivate dieser Studie als ein neuartiger Typ von PPIase-Inhibitoren mit Potenzial als antibakterielles Therapeutikum betrachtet werden können (Rasch *et al.*, 2015).

6.4 *L. pneumophila* und die evolutionäre Anpassung an Metazoen

Häufig treten Umweltbakterien wie Legionellen als gefährliche Humanpathogene in Erscheinung. In Hinblick auf die evolutionäre Anpassung der Bakterien auf den Menschen als *dead end*-Wirt, wird die Beziehung zwischen Legionellen und Protozoen als wichtiger Faktor für die Präadaptation an humane Phagozyten wie alveolare Makrophagen angesehen (Ünal *et al.*, 2011; Brassinga and Sifri, 2013). Dennoch kann die Evolution mancher Virulenzfaktoren nicht auf die Assoziierung mit Protozoen zurückgeführt werden, da diese eine hohe Spezifität und Relevanz für die Infektion von multizellulären Organismen oder Geweben haben. Einer dieser Virulenzfaktoren ist das Mip-Protein, welches in der Lage ist, an Kollagen IV zu binden (Wagner *et al.*, 2007). Da *L. pneumophila* in erster Linie ein Umweltbakterium ist, könnte angenommen werden, dass die Bindung an Kollagen IV ein Zufall ist. Es kann aber auch sein, dass diese Bindung eine Kreuzreaktion darstellt und dass das natürliche Substrat in

aquatischen Biofilmen vorkommt, aber bisher nicht identifiziert wurde. Eine dritte Hypothese ist, dass die Adhäsion von Mip an Kollagen IV eine spezifische Adaptation ist, die evolutionär durch die Interaktion mit Metazoen in der Umwelt entstanden ist. Die Anwesenheit der ECM, welche unter anderem aus Kollagen IV besteht, wird als wichtiges Kennzeichen für die Evolution der Metazoen angesehen (Hutter *et al.*, 2000; Müller und Müller, 2003; Ünal *et al.*, 2011). Damit liegt die Vermutung nahe, dass die einfachen Metazoen zu dem diversen Wirtsspektrum der Legionellen zählen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Ko-Kultivierung des Biofilms mit *L. pneumophila* dazu führte, dass Protozoen wie *Oxytricha bifaria*, *Ciliophrya sp.* und *Stylonychia mytilus* besiedelt wurden. Legionellen scheinen insgesamt also ein breiteres natürliches Wirtsspektrum zu besitzen, als es bisher vermutet wurde. Außerdem wurden nach der Ko-Kultivierung auch Legionellen im Darm einer Nematode des Biofilms nachgewiesen. Dies legt die Vermutung nahe, dass auch die natürlich im Biofilm vorkommenden Legionellen in der Lage sind, in den Darm der Nematoden zu besiedeln. Diese Erkenntnis unterstützt die Hypothese, dass die Interaktion von Legionellen mit kollagenartigen Proteinen in ECM-ähnlichen Strukturen von niedrigen Metazoen durch evolutionäre Anpassung entwickelt hat. Daraus lässt sich wiederum schlussfolgern, dass die Bindung von Mip an Kollagen IV ebenso evolutionär bedingt ist.

Es stellt sich nun die Frage, welche Vorteile sich aus der Besiedlung von Nematoden für die Legionellen ergeben könnten. Im Rahmen dieser Arbeit konnte unter Laborbedingungen gezeigt werden, dass Legionellen nicht nur durch das direkte Fressen in den Darm von *C. elegans* gelangen können, sondern auch durch das Fressen von infizierten Amöben. Dies erleichtert es den Legionellen in den Verdauungstrakt zu gelangen, da sich Legionellen in Protozoen vermehren und sie durch das Fressen der Amöbe konzentriert in die Nematode aufgenommen werden. Beim der direkten Aufnahme, beispielsweise durch die Filtration von Wasser, würde nur vereinzelte Legionellen aufgenommen werden. Interessanterweise konnte bereits gezeigt werden, dass die Bakterien nach der Aufnahme im Verdauungstrakt der Würmer persistieren und sie sich dort sogar vermehren können (Brassinga und Sifri, 2013; Hellinga *et al.*, 2015). Diese Erkenntnisse lassen zusammen betrachtet die Hypothese zu, dass ein Teil der Legionellen in der Lage ist, den Darm der Nematoden wieder lebendig zu verlassen. Dies würde bedeuten, dass *L. pneumophila* die Nematoden als eine Art

Fortbewegungsvehikel verwenden könnten, um so schnell neue Habitate erschließen zu können.

Insgesamt sind mehr als 40 Humanpathogene oder deren Artverwandte dafür bekannt, eine Krankheit bei *C. elegans* auslösen zu können. *P. aeruginosa* war der erste beschriebene Pathogen mit breitem Wirtsspektrum, der in der Lage war, die Nematode *C. elegans* zu töten. Derzeit sind fünf charakteristische Mechanismen des langsamen Wurmsterbens identifiziert worden: Infektion mit Darmbesiedlung, dauerhafte Infektion, Invasion, Biofilmbildung und Toxin- bedingtes Abtöten (Tan, Mahajan-Miklos, *et al.*, 1999; Tan, Rahme, *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2002; Sifri *et al.*, 2005; Beale *et al.*, 2006; Dunbar *et al.*, 2012; López Hernández *et al.*, 2015). Je nach Stamm und Anzucht ist *P. aeruginosa* in der Lage, *C. elegans* mit drei verschiedenen Mechanismen zu töten. Die ersten zwei Methoden sind das schnelle Töten durch Toxine mit kleinem Molekulargewicht und das Töten durch Neurotoxine, wie Hydrogencyanid. Die dritte Methode ist das Abtöten durch Besiedlung des Darms. *E. coli* kann nach der Aufnahme durch das im Pharynx lokalisierte Mahlwerk einfach zerstört werden, weswegen keine intakten Bakterienzellen im Darm gefunden werden können. *P. aeruginosa* wird dagegen nicht zersetzt und akkumuliert deshalb immer weiter im Darm. Durch die zunehmende Verstopfung wird der Wurm langsam über die Dauer von zwei bis drei Tagen getötet (Mahajan-Miklos *et al.*, 1999; Tan, Mahajan-Miklos, *et al.*, 1999; Darby *et al.*, 1999; Gallagher und Manoil, 2001; Aballay und Ausubel, 2002). Auch *S. typhimurium* ist in der Lage *C. elegans* langsam durch Besiedlung zu töten. Dies nimmt aber im Vergleich zu *Pseudomonas* mehrere Tage in Anspruch. Die parentalen Hermaphroditen, die einmal *S. typhimurium* ausgesetzt waren, lebten noch so lange, dass sie weiter viele Nachkommen produzierten, die letztendlich aber auch aufgrund des Salmonellen-Einflusses starben. Deshalb war ein regelmäßiges Umsetzen der Würmer erforderlich, um die Letalität messen zu können (Aballay *et al.*, 2000). Auch im Rahmen dieser Arbeit mussten die Würmer regelmäßig umgesetzt werden, damit die durch *L. pneumophila* verursachte Todesrate quantifiziert werden konnte. Ein weiterer wichtiger Unterschied bei der Infektion mit *P. aeruginosa* und *S. typhimurium* ist die Nachhaltigkeit. Werden mit *P. aeruginosa* gefütterte Nematoden wieder auf einen *E. coli*-Rasen umgesetzt, werden die im Darm akkumulierten *Pseudomonaden* wieder durch den normalen, rhythmischen Ausscheidungsprozess entfernt und die Würmer leben bis das Ende ihrer normalen Lebensspanne erreicht ist. Ist *C. elegans*

jedoch einmal mit den Salmonellen infiziert worden, hat dies auch trotz Umsetzen auf *E.coli*-Rasen die Persistenz der Bakterien im Darm und die damit einhergehende Letalität der parentalen Würmer zur Folge. Als Grund hierfür wird vermutet, dass *S. typhimurium* in der Lage ist, sich an konservierten Rezeptoren im Darm anzuheften, was eine Ausscheidung verhindern würde (Aballay und Ausubel, 2002). Dies ist auch bei Legionellen denkbar. Das langsame Sterben nach 12 Tagen und das damit verbundene für die Quantifizierung nötige Umsetzen sprechen dafür, dass Legionellen *C. elegans* durch Verstopfung des Verdauungstrakts töten, denn ein Toxin-vermitteltes Ableben würde schneller stattfinden. Es wurde bereits gezeigt, dass Legionellen intakt in den Darm von *C. elegans* gelangen, dort persistieren und sich vermehren (Brassinga und Sifri, 2013; Hellinga *et al.*, 2015). Dies bedeutet, dass sich die Anzahl der Legionellen zum einen durch die stetige Aufnahme von Bakterien erhöht, aber zum anderen auch durch die Persistenz und durch die intestinale Vermehrung. Deshalb ist eine Verstopfung des Wurms sehr wahrscheinlich. Auch bei der Infektion von *C. elegans* mit Legionellen ist eine Anheftung der Bakterien im Darm denkbar, da der Darm der Nematoden mit Kollagen IV ausgekleidet ist und sich an der Oberfläche der Legionellen das Kollagen-bindende Mip-Protein befindet (Graham *et al.*, 1997; Wagner *et al.*, 2007). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Überlebenszeitanalyse ergab, dass Würmer, die mit Mip-negativen Legionellen kultiviert wurden eine verzögerte Letalität aufwiesen. Auch die Anzahl der Mip-negativen Legionellen im Darm war während des Infektionsverlaufs im Vergleich zum Wildtyp geringer. Dies könnte durch einen Nachteil des Mip-negativen Stamms in der Replikation hervorgerufen werden. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass es zu einer geringeren Akkumulation der Bakterien kommt, da ohne Mip-Protein die Adhärenz an das Kollagen IV im Darm nicht stattfindet und somit vermehrt Bakterien ausgeschieden werden können.

Über die Vermehrung von Legionellen im Verdauungstrakt von *C. elegans* ist bereits bekannt, dass Bakterien sechs bis sieben Tage nach Infektion in der Körperhöhle und gonadalen Gewebe der Nematode nachgewiesen werden konnten. Nach vier bis sieben Tagen wurden die Bakterien ebenso in der Vulva-Region, aber nicht in den Muskeln der Vulva, beobachtet. Außerdem sind die Legionellen in der Lage gewesen, sich im intestinalen Epithelgewebe intrazellulär zu vermehren. Die Infektion der Würmer mit einer DotA-negativen Mutante hatte dagegen eine signifikant verringerte Anzahl von beobachteten LCVs zur Folge. Außerdem verlängerte die Abwesenheit von DotA- die

Lebensspanne der Würmer. Aus der Gesamtheit der Ergebnisse wurde geschlussfolgert, dass die Aufnahme und die Etablierung der LCVs in das gonadale Gewebe ein integraler Teil der Dot/Icm System-abhängigen Krankheitspathologie von mit Legionellen kolonisierten Würmern ist (Hellinga *et al.*, 2015).

Auch im Rahmen dieser Arbeit konnte eine verzögerte Letalität von Nematoden beobachtet werden, die mit der DotA-Mutante kultiviert wurden. Während die mittlere Lebensspanne ohne Mip um zwei Tage verlängert war, war die ohne DotA jedoch nur einen Tag länger. Die bestimmte cfu pro Nematode war bei Kultivierung mit der DotA-Mutante jedoch genauso hoch wie die der mit Wildtyp angezogenen Würmer. Diese Ergebnisse deuten also darauf hin, dass mit Legionellen gefütterte Würmer anscheinend nicht nur durch Verstopfung zu sterben scheinen, sondern auch durch die Ausbreitung der Legionellen im Gewebe des Wurms und die damit einhergehenden Begleiterscheinungen einer Infektion. Da die Verzögerung des Ablebens der Würmer mit der *mip*-Deletionsmutante jedoch stärker war, scheint die Verstopfung insgesamt aber schwerwiegender zu sein.

Insgesamt gesehen waren Protozoen bisher als einzige natürliche Wirte für den intrazellulären Lebensstil der Legionellen bekannt (Hägele *et al.*, 2000; Newton *et al.*, 2010; Escoll *et al.*, 2013; Hellinga *et al.*, 2015). Nachdem *C. elegans* als funktionierendes Wirtssystem für Legionellen etabliert wurde, wurde aufgrund der ähnlichen Habitate beider Organismen bereits eine natürliche Interaktion vermutet (Brassinga und Sifri, 2013; Hellinga *et al.*, 2015). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Legionellen tatsächlich in der Lage sind, Würmer und Protozoen eines natürlichen Biofilms zu besiedeln. Außerdem wurde gezeigt, dass das Mip-Protein eine Rolle für das Überleben der Würmer und für die Anzahl der intrainestinalen Bakterien spielt, was vermutlich auf die Kollagen-bindende Eigenschaft des Mip-Proteins zurückzuführen ist. Damit kann die Hypothese unterstützt werden, dass die Adhäsion von Mip an Kollagen IV eine spezifische Adaptation ist, die evolutionär durch die Interaktion mit Metazoen in der Umwelt entstanden ist. Metazoen tragen also wahrscheinlich als Wirt zu der Persistenz, Verbreitung und Evolution der *Legionella*-Spezies bei.

6.5 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Sekretom der *mip*-Deletionsmutante verändert vorliegt. Eins der akkumulierten Proteine war Mrf, was als für die intrazelluläre Replikation relevanter Virulenzfaktor charakterisiert wurde. In weiterführenden Experimenten könnte Mrf rekombinant produziert werden, um zum einen eine mögliche Interaktion mit Mip zu untersuchen und um zum anderen die Kristallstruktur zu ermitteln. Außerdem kann eine Doppelmutante $\Delta mip \Delta mrf$ generiert werden. Diese sollte in Infektionsstudien untersucht werden, um herauszufinden, ob die Deletion beider Proteine eine zusätzliche Schwächung der Replikation zur Folge hat. Wenn Mip wie vermutet Mrf aktivieren kann, sollte sich die Doppelmutante wie die beiden Einzelmutanten verhalten. Des Weiteren können auch weitere Mip-abhängig sezernierte Kandidaten charakterisiert werden. Interessant wäre beispielsweise zu zeigen, ob Mip wie vermutet mit PlcB interagiert, was zu einer Beeinflussung der Hydrolaseaktivität im Sekretom führt. Kann eine Interaktion zwischen Mip und PlcB gezeigt werden, ist dies der erste Beweis der Rolle von Mip als regulierendes Protein. Außerdem kann untersucht werden, ob auch andere PPIasen einen Einfluss auf Phospholipasen und die Hydrolaseaktivität haben. Da im Rahmen dieser Arbeit ein kompensatorischer Effekt zwischen der PPIase-Funktion von Mip und PpiB beobachtet wurde, ist es möglich, dass auch PpiB einen Einfluss auf PlcB hat. Wegen der beobachteten Kompensation der PPIasen untereinander, kann das Sekretom anderer PPIase Einzel- und Doppelmutanten analysiert und verglichen werden, um gemeinsam regulierte Proteine zu identifizieren und charakterisieren.

Legionellen sind in der Lage, Würmer und andere Metazoen eines natürlichen Biofilms zu besiedeln. Außerdem konnte gezeigt werden, dass das Mip-Protein eine Rolle für das Überleben der Würmer und für die Anzahl der inraintestinalen Bakterien spielt, was vermutlich auf die Kollagen-bindende Eigenschaft des Mip-Proteins zurückzuführen ist. Um die Hypothese zu bestätigen, dass Legionellen an den Darm von *C. elegans* binden, ist es sinnvoll, die Nematoden für einige Tage auf *L. pneumophila*-Rasen zu kultivieren und dann auf *E. coli* zu überimpfen. Wenn die Letalität dann der Todesrate bei durchgehender Kultivierung entspricht, kann die Hypothese bestätigt werden, dass die Legionellen durch Bindung im Darm verbleiben.

7 Literaturverzeichnis

Aballay, A., and Ausubel, F.M. (2002) *Caenorhabditis elegans* as a host for the study of host-pathogen interactions. *Curr Opin Microbiol* **5**: 97–101.

Aballay, A., Yorgey, P., and Ausubel, F.M. (2000) *Salmonella typhimurium* proliferates and establishes a persistent infection in the intestine of *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol CB* **10**: 1539–1542.

Adeleke, A.A., Fields, B.S., Benson, R.F., Daneshvar, M.I., Pruckler, J.M., Ratcliff, R.M., *et al.* (2001) *Legionella drozanskii* sp. nov., *Legionella rowbothamii* sp. nov. and *Legionella fallonii* sp. nov.: three unusual new *Legionella* species. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**: 1151–1160.

Adeleke, A., Pruckler, J., Benson, R., Rowbotham, T., Halablab, M., and Fields, B. (1996) *Legionella*-like amebal pathogens--phylogenetic status and possible role in respiratory disease. *Emerg Infect Dis* **2**: 225–230.

Alleron, L., Merlet, N., Lacombe, C., and Frère, J. (2008) Long-term survival of *Legionella pneumophila* in the viable but nonculturable state after monochloramine treatment. *Curr Microbiol* **57**: 497–502.

Aragon, V., Kurtz, S., and Cianciotto, N.P. (2001) *Legionella pneumophila* major acid phosphatase and its role in intracellular infection. *Infect Immun* **69**: 177–185.

Aragon, V., Rossier, O., and Cianciotto, N.P. (2002) *Legionella pneumophila* genes that encode lipase and phospholipase C activities. *Microbiol Read Engl* **148**: 2223–2231.

Atlas, R.M. (1999) *Legionella*: from environmental habitats to disease pathology, detection and control. *Environ Microbiol* **1**: 283–293.

Aurass, P., Schlegel, M., Metwally, O., Harding, C.R., Schroeder, G.N., Frankel, G., and Flieger, A. (2013) The *Legionella pneumophila* Dot/Icm-secreted Effector PlcC/CegC1 Together with PlcA and PlcB Promotes Virulence and Belongs to a Novel Zinc Metallophospholipase C Family Present in Bacteria and Fungi. *J Biol Chem* **288**: 11080–11092.

Babine, R.E., Bleckman, T.M., Kissinger, C.R., Showalter, R., Pelletier, L.A., Lewis, C., *et al.* (1995) Design, synthesis and X-ray crystallographic studies of novel FKBP-12 ligands. *Bioorg Med Chem Lett* **5**: 1719–1724.

Barker, J., and Till, D.H. (1986) Survival of *Legionella pneumophila*. *Med Lab Sci* **43**: 388–389.

Baskerville, A., Fitzgeorge, R.B., Broster, M., Hambleton, P., and Dennis, P.J. (1981) Experimental transmission of legionnaires' disease by exposure to aerosols of *Legionella pneumophila*. *Lancet* **2**: 1389–1390.

- Beale, E., Li, G., Tan, M.-W., and Rumbaugh, K.P. (2006) *Caenorhabditis elegans* senses bacterial autoinducers. *Appl Environ Microbiol* **72**: 5135–5137.
- Beckers, M.C., Yoshida, S., Morgan, K., Skamene, E., and Gros, P. (1995) Natural resistance to infection with *Legionella pneumophila*: chromosomal localization of the Lgn1 susceptibility gene. *Mamm Genome Off J Int Mamm Genome Soc* **6**: 540–545.
- Begley, D.W., Fox, D., Jenner, D., Juli, C., Pierce, P.G., Abendroth, J., *et al.* (2014) A structural biology approach enables the development of antimicrobials targeting bacterial immunophilins. *Antimicrob Agents Chemother* **58**: 1458–1467.
- Bellinger-Kawahara, C., and Horwitz, M.A. (1990) Complement component C3 fixes selectively to the major outer membrane protein (MOMP) of *Legionella pneumophila* and mediates phagocytosis of liposome-MOMP complexes by human monocytes. *J Exp Med* **172**: 1201–1210.
- Berendt, R.F., Young, H.W., Allen, R.G., and Knutsen, G.L. (1980) Dose-response of guinea pigs experimentally infected with aerosols of *Legionella pneumophila*. *J Infect Dis* **141**: 186–192.
- Bergmann, S., Schoenen, H., and Hammerschmidt, S. (2013) The interaction between bacterial enolase and plasminogen promotes adherence of *Streptococcus pneumoniae* to epithelial and endothelial cells. *Int J Med Microbiol IJMM* **303**: 452–462.
- Blander, S.J., Szeto, L., Shuman, H.A., and Horwitz, M.A. (1990) An immunoprotective molecule, the major secretory protein of *Legionella pneumophila*, is not a virulence factor in a guinea pig model of Legionnaires' disease. *J Clin Invest* **86**: 817–824.
- Blaxter, M. (1998) *Caenorhabditis elegans* is a nematode. *Science* **282**: 2041–2046.
- Borella, P., Guerrieri, E., Marchesi, I., Bondi, M., and Messi, P. (2005) Water ecology of *Legionella* and protozoan: environmental and public health perspectives. *Biotechnol Annu Rev* **11**: 355–380.
- Bozue, J.A., and Johnson, W. (1996) Interaction of *Legionella pneumophila* with *Acanthamoeba castellanii*: uptake by coiling phagocytosis and inhibition of phagosome-lysosome fusion. *Infect Immun* **64**: 668–673.
- Brandts, J.F., Halvorson, H.R., and Brennan, M. (1975) Consideration of the Possibility that the slow step in protein denaturation reactions is due to cis-trans isomerism of proline residues. *Biochemistry (Mosc)* **14**: 4953–4963.
- Brassinga, A.K.C., and Sifri, C.D. (2013) The *Caenorhabditis elegans* model of *Legionella* infection. *Methods Mol Biol Clifton NJ* **954**: 439–461.
- Breiman, R.F., and Butler, J.C. (1998) Legionnaires' disease: clinical, epidemiological, and public health perspectives. *Semin Respir Infect* **13**: 84–89.
- Brenner, S. (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**: 71–94.

- Brieland, J., Freeman, P., Kunkel, R., Chrisp, C., Hurley, M., Fantone, J., and Engleberg, C. (1994) Replicative *Legionella pneumophila* lung infection in intratracheally inoculated A/J mice. A murine model of human Legionnaires' disease. *Am J Pathol* **145**: 1537–1546.
- Cahoon, L.A., and Freitag, N.E. (2014) *Listeria monocytogenes* virulence factor secretion: don't leave the cell without a chaperone. *Front Cell Infect Microbiol* **4**: 13.
- Cazalet, C., Rusniok, C., Brüggemann, H., Zidane, N., Magnier, A., Ma, L., *et al.* (2004) Evidence in the *Legionella pneumophila* genome for exploitation of host cell functions and high genome plasticity. *Nat Genet* **36**: 1165–1173.
- Ceymann, A., Horstmann, M., Ehses, P., Schweimer, K., Paschke, A.-K., Steinert, M., and Faber, C. (2008) Solution structure of the *Legionella pneumophila* Mip-rapamycin complex. *BMC Struct Biol* **8**: 17.
- Chaabna, Z., Forey, F., Reyrolle, M., Jarraud, S., Atlan, D., Fontvieille, D., and Gilbert, C. (2013) Molecular diversity and high virulence of *Legionella pneumophila* strains isolated from biofilms developed within a warm spring of a thermal spa. *BMC Microbiol* **13**: 17.
- Charpentier, X., Kay, E., Schneider, D., and Shuman, H.A. (2011) Antibiotics and UV radiation induce competence for natural transformation in *Legionella pneumophila*. *J Bacteriol* **193**: 1114–1121.
- Chatfield, C.H., and Cianciotto, N.P. (2007) The secreted pyomelanin pigment of *Legionella pneumophila* confers ferric reductase activity. *Infect Immun* **75**: 4062–4070.
- Christie, P.J., and Vogel, J.P. (2000) Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trends Microbiol* **8**: 354–360.
- Christner, C., Wyrwa, R., Marsch, S., Küllertz, G., Thiericke, R., Grabley, S., *et al.* (1999) Synthesis and cytotoxic evaluation of cycloheximide derivatives as potential inhibitors of FKBP12 with neuroregenerative properties. *J Med Chem* **42**: 3615–3622.
- Cianciotto, N.P. (2005) Type II secretion: a protein secretion system for all seasons. *Trends Microbiol* **13**: 581–588.
- Cianciotto, N.P. (2007) Iron acquisition by *Legionella pneumophila*. *Biometals Int J Role Met Ions Biol Biochem Med* **20**: 323–331.
- Cianciotto, N.P. (2009) Many substrates and functions of type II secretion: lessons learned from *Legionella pneumophila*. *Future Microbiol* **4**: 797–805.
- Cianciotto, N.P., Eisenstein, B.I., Mody, C.H., and Engleberg, N.C. (1990) A mutation in the mip gene results in an attenuation of *Legionella pneumophila* virulence. *J Infect Dis* **162**: 121–126.
- Cianciotto, N.P., Eisenstein, B.I., Mody, C.H., Toews, G.B., and Engleberg, N.C. (1989) A *Legionella pneumophila* gene encoding a species-specific surface protein potentiates initiation of intracellular infection. *Infect Immun* **57**: 1255–1262.

- Cianciotto, N.P., and Fields, B.S. (1992) *Legionella pneumophila* mip gene potentiates intracellular infection of protozoa and human macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 5188–5191.
- Cirillo, J.D., Falkow, S., and Tompkins, L.S. (1994) Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion. *Infect Immun* **62**: 3254–3261.
- Cirillo, S.L., Bermudez, L.E., El-Etr, S.H., Duhamel, G.E., and Cirillo, J.D. (2001) *Legionella pneumophila* entry gene rtxA is involved in virulence. *Infect Immun* **69**: 508–517.
- Coil, D.A., and Anné, J. (2009) Twitching motility in *Legionella pneumophila*. *FEMS Microbiol Lett* **293**: 271–277.
- Cook, K.H., Schmid, F.X., and Baldwin, R.L. (1979) Role of proline isomerization in folding of ribonuclease A at low temperatures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 6157–6161.
- Corsi, A.K. (2006) A biochemist's guide to *Caenorhabditis elegans*. *Anal Biochem* **359**: 1–17.
- Daisy, J.A., Benson, C.E., McKittrick, J., and Friedman, H.M. (1981) Intracellular replication of *Legionella pneumophila*. *J Infect Dis* **143**: 460–464.
- Darby, C., Cosma, C.L., Thomas, J.H., and Manoel, C. (1999) Lethal paralysis of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 15202–15207.
- Dartigalongue, C., and Raina, S. (1998) A new heat-shock gene, *ppiD*, encodes a peptidyl-prolyl isomerase required for folding of outer membrane proteins in *Escherichia coli*. *EMBO J* **17**: 3968–3980.
- Debroy, S., Aragon, V., Kurtz, S., and Cianciotto, N.P. (2006) *Legionella pneumophila* Mip, a surface-exposed peptidylproline cis-trans-isomerase, promotes the presence of phospholipase C-like activity in culture supernatants. *Infect Immun* **74**: 5152–5160.
- DebRoy, S., Keenan, A.B., Ueno, N., Jeronimo, S.M.B., Donelson, J.E., and Wilson, M.E. (2010) *Leishmania infantum chagasi*: a genome-based approach to identification of excreted/secreted proteins. *Exp Parasitol* **126**: 582–591.
- Declerck, P. (2010) Biofilms: the environmental playground of *Legionella pneumophila*. *Environ Microbiol* **12**: 557–566.
- Dehio, C., Gray-Owen, S.D., and Meyer, T.F. (1998) The role of neisserial Opa proteins in interactions with host cells. *Trends Microbiol* **6**: 489–495.
- Dekker, N.P., Lammel, C.J., Mandrell, R.E., and Brooks, G.F. (1990) Opa (protein II) influences gonococcal organization in colonies, surface appearance, size and attachment to human fallopian tube tissues. *Microb Pathog* **9**: 19–31.

- Delepelaire, P. (2004) Type I secretion in gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res* **1694**: 149–161.
- Diederer, B.M.W. (2008) *Legionella* spp. and Legionnaires' disease. *J Infect* **56**: 1–12.
- Dietrich, C., Heuner, K., Brand, B.C., Hacker, J., and Steinert, M. (2001) Flagellum of *Legionella pneumophila* positively affects the early phase of infection of eukaryotic host cells. *Infect Immun* **69**: 2116–2122.
- Drawert, F. (2013) *Legionella*-Wirtszell-Interaktionen und Analyse neuer Wirkstoffe und Wirkstoffträger. .
- Dreyfus, L.A., and Iglewski, B.H. (1986) Purification and characterization of an extracellular protease of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* **51**: 736–743.
- Dunbar, T.L., Yan, Z., Balla, K.M., Smelkinson, M.G., and Troemel, E.R. (2012) *C. elegans* detects pathogen-induced translational inhibition to activate immune signaling. *Cell Host Microbe* **11**: 375–386.
- Echenique-Rivera, H., Muzzi, A., Tordello, E. Del, Seib, K.L., Francois, P., Rappuoli, R., *et al.* (2011) Transcriptome analysis of *Neisseria meningitidis* in human whole blood and mutagenesis studies identify virulence factors involved in blood survival. *PLoS Pathog* **7**: e1002027.
- Edelstein, P.H., Edelstein, M.A., Higa, F., and Falkow, S. (1999) Discovery of virulence genes of *Legionella pneumophila* by using signature tagged mutagenesis in a guinea pig pneumonia model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 8190–8195.
- Ellis, T.N., and Kuehn, M.J. (2010) Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR* **74**: 81–94.
- England, A.C., Fraser, D.W., Mallison, G.F., Mackel, D.C., Skaliy, P., and Gorman, G.W. (1982) Failure of *Legionella pneumophila* sensitivities to predict culture results from disinfectant-treated air-conditioning cooling towers. *Appl Environ Microbiol* **43**: 240–244.
- Engleberg, N.C., Carter, C., Weber, D.R., Cianciotto, N.P., and Eisenstein, B.I. (1989) DNA sequence of mip, a *Legionella pneumophila* gene associated with macrophage infectivity. *Infect Immun* **57**: 1263–1270.
- Escoll, P., Rolando, M., Gomez-Valero, L., and Buchrieser, C. (2013) From amoeba to macrophages: exploring the molecular mechanisms of *Legionella pneumophila* infection in both hosts. *Curr Top Microbiol Immunol* **376**: 1–34.
- Fernandez-Moreira, E., Helbig, J.H., and Swanson, M.S. (2006) Membrane vesicles shed by *Legionella pneumophila* inhibit fusion of phagosomes with lysosomes. *Infect Immun* **74**: 3285–3295.
- Fischer, G., Bang, H., Ludwig, B., Mann, K., and Hacker, J. (1992) Mip protein of *Legionella pneumophila* exhibits peptidyl-prolyl-cis/trans isomerase (PPlase) activity. *Mol Microbiol* **6**: 1375–1383.

- Fitzgeorge, R.B., and Dennis, P.J. (1983) Isolation of *Legionella pneumophila* from water supplies: comparison of methods based on the guinea-pig and culture media. *J Hyg (Lond)* **91**: 179–187.
- Fraser, D.W., Tsai, T.R., Orenstein, W., Parkin, W.E., Beecham, H.J., Sharrar, R.G., *et al.* (1977) Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. *N Engl J Med* **297**: 1189–1197.
- Fuche, F., Vianney, A., Andrea, C., Doublet, P., and Gilbert, C. (2015) Functional type 1 secretion system involved in *Legionella pneumophila* virulence. *J Bacteriol* **197**: 563–571.
- Galka, F., Wai, S.N., Kusch, H., Engelmann, S., Hecker, M., Schmeck, B., *et al.* (2008) Proteomic characterization of the whole secretome of *Legionella pneumophila* and functional analysis of outer membrane vesicles. *Infect Immun* **76**: 1825–1836.
- Gallagher, L.A., and Manoil, C. (2001) *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 kills *Caenorhabditis elegans* by cyanide poisoning. *J Bacteriol* **183**: 6207–6214.
- García, M.T., Jones, S., Pelaz, C., Millar, R.D., and Kwaik, Y. Abu (2007) *Acanthamoeba polyphaga* resuscitates viable non-culturable *Legionella pneumophila* after disinfection. *Environ Microbiol* **9**: 1267–1277.
- Gems, D., and Riddle, D.L. (2000) Genetic, behavioral and environmental determinants of male longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **154**: 1597–1610.
- Ge, X., Lyu, Z.-X., Liu, Y., Wang, R., Zhao, X.S., Fu, X., and Chang, Z. (2014) Identification of FkpA as a key quality control factor for the biogenesis of outer membrane proteins under heat shock conditions. *J Bacteriol* **196**: 672–680.
- Gibson, F.C., Tzianabos, A.O., and Rodgers, F.G. (1994) Adherence of *Legionella pneumophila* to U-937 cells, guinea-pig alveolar macrophages, and MRC-5 cells by a novel, complement-independent binding mechanism. *Can J Microbiol* **40**: 865–872.
- Glöckner, G., Albert-Weissenberger, C., Weinmann, E., Jacobi, S., Schunder, E., Steinert, M., *et al.* (2008) Identification and characterization of a new conjugation/type IVA secretion system (trb/tra) of *Legionella pneumophila* Corby localized on two mobile genomic islands. *Int J Med Microbiol IJMM* **298**: 411–428.
- Göthel, S.F., Herrler, M., and Marahiel, M.A. (1996) Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase of *Bacillus subtilis*: identification of residues involved in cyclosporin A affinity and catalytic efficiency. *Biochemistry (Mosc)* **35**: 3636–3640.
- Graham, P.L., Johnson, J.J., Wang, S., Sibley, M.H., Gupta, M.C., and Kramer, J.M. (1997) Type IV collagen is detectable in most, but not all, basement membranes of *Caenorhabditis elegans* and assembles on tissues that do not express it. *J Cell Biol* **137**: 1171–1183.
- Graumann, P., Schröder, K., Schmid, R., and Marahiel, M.A. (1996) Cold shock stress-induced proteins in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **178**: 4611–4619.

- Hacker, J., Ott, M., Wintermeyer, E., Ludwig, B., and Fischer, G. (1993) Analysis of virulence factors of *Legionella pneumophila*. *Zentralblatt Für Bakteriologie Int J Med Microbiol* **278**: 348–358.
- Hägele, S., Köhler, R., Merkert, H., Schleicher, M., Hacker, J., and Steinert, M. (2000) *Dictyostelium discoideum*: a new host model system for intracellular pathogens of the genus *Legionella*. *Cell Microbiol* **2**: 165–171.
- Hales, L.M., and Shuman, H.A. (1999) *Legionella pneumophila* contains a type II general secretion pathway required for growth in amoebae as well as for secretion of the Msp protease. *Infect Immun* **67**: 3662–3666.
- Harding, C.R., Schroeder, G.N., Reynolds, S., Kosta, A., Collins, J.W., Mousnier, A., and Frankel, G. (2012) *Legionella pneumophila* pathogenesis in the *Galleria mellonella* infection model. *Infect Immun* **80**: 2780–2790.
- Harikishore, A., Niang, M., Rajan, S., Preiser, P.R., and Yoon, H.S. (2013) Small molecule Plasmodium FKBP35 inhibitor as a potential antimalaria agent. *Sci Rep* **3**: 2501.
- Hauck, C.R., and Meyer, T.F. (2003) “Small” talk: Opa proteins as mediators of *Neisseria*-host-cell communication. *Curr Opin Microbiol* **6**: 43–49.
- Heinsohn, N. (2013) Einfluss der Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerasen Mip und PpiB auf Wachstum und Motilität von *L. pneumophila*.
- Helbig, J.H., Lück, P.C., Knirel, Y.A., Witzleb, W., and Zähringer, U. (1995) Molecular characterization of a virulence-associated epitope on the lipopolysaccharide of *Legionella pneumophila* serogroup 1. *Epidemiol Infect* **115**: 71–78.
- Helbig, J.H., Lück, P.C., Steinert, M., Jacobs, E., and Witt, M. (2001) Immunolocalization of the Mip protein of intracellularly and extracellularly grown *Legionella pneumophila*. *Lett Appl Microbiol* **32**: 83–88.
- Helbig, J.H., Ludwig, B., Lück, P.C., Groh, A., Witzleb, W., and Hacker, J. (1995) Monoclonal antibodies to *Legionella* Mip proteins recognize genus- and species-specific epitopes. *Clin Diagn Lab Immunol* **2**: 160–165.
- Hellinga, J.R., Garduño, R.A., Kormish, J.D., Tanner, J.R., Khan, D., Buchko, K., et al. (2015) Identification of vacuoles containing extraintestinal differentiated forms of *Legionella pneumophila* in colonized *Caenorhabditis elegans* soil nematodes. *MicrobiologyOpen*.
- Henderson, B., and Martin, A.C.R. (2014) Protein moonlighting: a new factor in biology and medicine. *Biochem Soc Trans* **42**: 1671–1678.
- Heuner, K., Dietrich, C., Skriwan, C., Steinert, M., and Hacker, J. (2002) Influence of the alternative sigma(28) factor on virulence and flagellum expression of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* **70**: 1604–1608.

- Hilbi, H., Segal, G., and Shuman, H.A. (2001) Icm/dot-dependent upregulation of phagocytosis by *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol* **42**: 603–617.
- Hoffmann, A., Bukau, B., and Kramer, G. (2010) Structure and function of the molecular chaperone Trigger Factor. *Biochim Biophys Acta* **1803**: 650–661.
- Hoffmann, C., Harrison, C.F., and Hilbi, H. (2014) The natural alternative: protozoa as cellular models for *Legionella* infection. *Cell Microbiol* **16**: 15–26.
- Hori, J.I., and Zamboni, D.S. (2013) The mouse as a model for pulmonary *legionella* infection. *Methods Mol Biol Clifton NJ* **954**: 493–503.
- Horne, S.M., and Young, K.D. (1995) *Escherichia coli* and other species of the Enterobacteriaceae encode a protein similar to the family of Mip-like FK506-binding proteins. *Arch Microbiol* **163**: 357–365.
- Horstmann, M., Ehse, P., Schweimer, K., Steinert, M., Kamphausen, T., Fischer, G., *et al.* (2006) Domain motions of the Mip protein from *Legionella pneumophila*. *Biochemistry (Mosc)* **45**: 12303–12311.
- Horstmann, M., Kamphausen, T., Schweimer, K., Steinert, M., Hacker, J., Haase, A., *et al.* (2005) ¹H, ¹³C, ¹⁵N backbone and sidechain resonance assignment of Mip(77–213) the PPIase domain of the *Legionella pneumophila* Mip protein. *J Biomol NMR* **31**: 77–78.
- Huang, S.-W., Hsu, B.-M., Wu, S.-F., Fan, C.-W., Shih, F.-C., Lin, Y.-C., and Ji, D.-D. (2010) Water quality parameters associated with prevalence of *Legionella* in hot spring facility water bodies. *Water Res* **44**: 4805–4811.
- Husmann, L.K., and Johnson, W. (1992) Adherence of *Legionella pneumophila* to guinea pig peritoneal macrophages, J774 mouse macrophages, and undifferentiated U937 human monocytes: role of Fc and complement receptors. *Infect Immun* **60**: 5212–5218.
- Hutter, H., Vogel, B.E., Plenefisch, J.D., Norris, C.R., Proenca, R.B., Spieth, J., *et al.* (2000) Conservation and novelty in the evolution of cell adhesion and extracellular matrix genes. *Science* **287**: 989–994.
- Jacobi, S., and Heuner, K. (2003) Description of a putative type I secretion system in *Legionella pneumophila*. *Int J Med Microbiol IJMM* **293**: 349–358.
- Jäger, J., Keese, S., Roessle, M., Steinert, M., and Schromm, A.B. (2014) Fusion of *Legionella pneumophila* outer membrane vesicles with eukaryotic membrane systems is a mechanism to deliver pathogen factors to host cell membranes. *Cell Microbiol* .
- Jäger, J., Marwitz, S., Tiefenau, J., Rasch, J., Shevchuk, O., Kugler, C., *et al.* (2014) Human lung tissue explants reveal novel interactions during *Legionella pneumophila* infections. *Infect Immun* **82**: 275–285.

- Jepras, R.I., Fitzgeorge, R.B., and Baskerville, A. (1985) A comparison of virulence of two strains of *Legionella pneumophila* based on experimental aerosol infection of guinea-pigs. *J Hyg (Lond)* **95**: 29–38.
- Jerse, A.E., Cohen, M.S., Drown, P.M., Whicker, L.G., Isbey, S.F., Seifert, H.S., and Cannon, J.G. (1994) Multiple gonococcal opacity proteins are expressed during experimental urethral infection in the male. *J Exp Med* **179**: 911–920.
- Jerse, A.E., and Rest, R.F. (1997) Adhesion and invasion by the pathogenic *neisseria*. *Trends Microbiol* **5**: 217–221.
- Juli, C., Sippel, M., Jäger, J., Thiele, A., Weiwad, M., Schweimer, K., *et al.* (2011) Pipecolic acid derivatives as small-molecule inhibitors of the *Legionella* MIP protein. *J Med Chem* **54**: 277–283.
- Kagan, J.C., and Roy, C.R. (2002) *Legionella* phagosomes intercept vesicular traffic from endoplasmic reticulum exit sites. *Nat Cell Biol* **4**: 945–954.
- Keen, M.G., and Hoffman, P.S. (1989) Characterization of a *Legionella pneumophila* extracellular protease exhibiting hemolytic and cytotoxic activities. *Infect Immun* **57**: 732–738.
- Kessin, R.H., Gundersen, G.G., Zaydfudim, V., and Grimson, M. (1996) How cellular slime molds evade nematodes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 4857–4861.
- Kilvington, S., and Price, J. (1990) Survival of *Legionella pneumophila* within cysts of *Acanthamoeba polyphaga* following chlorine exposure. *J Appl Bacteriol* **68**: 519–525.
- Kirby, J.E., Vogel, J.P., Andrews, H.L., and Isberg, R.R. (1998) Evidence for pore-forming ability by *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol* **27**: 323–336.
- Klages, A. (2015) Die Analyse von Mip-abhängig sezernierten Proteinen und deren Einfluss auf Stresstoleranz. .
- Köhler, R., Fanghänel, J., König, B., Lüneberg, E., Frosch, M., Rahfeld, J.-U., *et al.* (2003) Biochemical and functional analyses of the Mip protein: influence of the N-terminal half and of peptidylprolyl isomerase activity on the virulence of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* **71**: 4389–4397.
- Komura, T., Yasui, C., Miyamoto, H., and Nishikawa, Y. (2010) *Caenorhabditis elegans* as an alternative model host for *legionella pneumophila*, and protective effects of *Bifidobacterium infantis*. *Appl Environ Microbiol* **76**: 4105–4108.
- Krinos, C., High, A.S., and Rodgers, F.G. (1999) Role of the 25 kDa major outer membrane protein of *Legionella pneumophila* in attachment to U-937 cells and its potential as a virulence factor for chick embryos. *J Appl Microbiol* **86**: 237–244.
- Krüger, S. (2013) Funktionelle Analyse des Virulenzfaktors Mip und Aufreinigung der Zink-Metalloprotease ProA von *Legionella pneumophila*. .

- Kubori, T., Shinzawa, N., Kanuka, H., and Nagai, H. (2010) *Legionella* metaeffector exploits host proteasome to temporally regulate cognate effector. *PLoS Pathog* **6**: e1001216.
- Kupsch, E.M., Knepper, B., Kuroki, T., Heuer, I., and Meyer, T.F. (1993) Variable opacity (Opa) outer membrane proteins account for the cell tropisms displayed by *Neisseria gonorrhoeae* for human leukocytes and epithelial cells. *EMBO J* **12**: 641–650.
- Kusnetsov, J.M., Ottoila, E., and Martikainen, P.J. (1996) Growth, respiration and survival of *Legionella pneumophila* at high temperatures. *J Appl Bacteriol* **81**: 341–347.
- Kwaik, Y., Abu, Gao, L.Y., Stone, B.J., Venkataraman, C., and Harb, O.S. (1998) Invasion of protozoa by *Legionella pneumophila* and its role in bacterial ecology and pathogenesis. *Appl Environ Microbiol* **64**: 3127–3133.
- Lammertyn, E., and Anné, J. (2004) Protein secretion in *Legionella pneumophila* and its relation to virulence. *FEMS Microbiol Lett* **238**: 273–279.
- Leuzzi, R., Serino, L., Scarselli, M., Savino, S., Fontana, M.R., Monaci, E., *et al.* (2005) Ng-MIP, a surface-exposed lipoprotein of *Neisseria gonorrhoeae*, has a peptidyl-prolyl cis/trans isomerase (PPIase) activity and is involved in persistence in macrophages. *Mol Microbiol* **58**: 669–681.
- López Hernández, Y., Yero, D., Pinos-Rodríguez, J.M., and Gibert, I. (2015) Animals devoid of pulmonary system as infection models in the study of lung bacterial pathogens. *Front Microbiol* **6**: 38.
- Lucas, C.E., Brown, E., and Fields, B.S. (2006) Type IV pili and type II secretion play a limited role in *Legionella pneumophila* biofilm colonization and retention. *Microbiol Read Engl* **152**: 3569–3573.
- Lundemose, A.G., Rouch, D.A., Birkelund, S., Christiansen, G., and Pearce, J.H. (1992) *Chlamydia trachomatis* Mip-like protein. *Mol Microbiol* **6**: 2539–2548.
- Mahajan-Miklos, S., Tan, M.W., Rahme, L.G., and Ausubel, F.M. (1999) Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*-*Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. *Cell* **96**: 47–56.
- McDade, J.E., and Shepard, C.C. (1979) Virulent to avirulent conversion of Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*)-its effect on isolation techniques. *J Infect Dis* **139**: 707–711.
- McDade, J.E., Shepard, C.C., Fraser, D.W., Tsai, T.R., Redus, M.A., and Dowdle, W.R. (1977) Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *N Engl J Med* **297**: 1197–1203.
- Merino, S., Aguilar, A., Nogueras, M.M., Regue, M., Swift, S., and Tomás, J.M. (1999) Cloning, sequencing, and role in virulence of two phospholipases (A1 and C) from mesophilic *Aeromonas* sp. serogroup O:34. *Infect Immun* **67**: 4008–4013.

- Meyer, T.F. (1991) Evasion mechanisms of pathogenic Neisseriae. *Behring Inst Mitt* 194–199.
- Mody, C.H., Paine, R., Shahrabadi, M.S., Simon, R.H., Pearlman, E., Eisenstein, B.I., and Toews, G.B. (1993) *Legionella pneumophila* replicates within rat alveolar epithelial cells. *J Infect Dis* 167: 1138–1145.
- Moffat, J.F., Edelstein, P.H., Regula, D.P., Cirillo, J.D., and Tompkins, L.S. (1994) Effects of an isogenic Zn-metalloprotease-deficient mutant of *Legionella pneumophila* in a guinea-pig pneumonia model. *Mol Microbiol* 12: 693–705.
- Molmeret, M., Horn, M., Wagner, M., Santic, M., and Kwaik, Y. Abu (2005) Amoebae as training grounds for intracellular bacterial pathogens. *Appl Environ Microbiol* 71: 20–28.
- Molofsky, A.B., and Swanson, M.S. (2004) Differentiate to thrive: lessons from the *Legionella pneumophila* life cycle. *Mol Microbiol* 53: 29–40.
- Moreno-Arriola, E., Cárdenas-Rodríguez, N., Coballase-Urrutia, E., Pedraza-Chaverri, J., Carmona-Aparicio, L., and Ortega-Cuellar, D. (2014) *Caenorhabditis elegans*: A useful model for studying metabolic disorders in which oxidative stress is a contributing factor. *Oxid Med Cell Longev* 2014: 705253.
- Moro, A., Ruiz-Cabello, F., Fernández-Cano, A., Stock, R.P., and González, A. (1995) Secretion by *Trypanosoma cruzi* of a peptidyl-prolyl cis-trans isomerase involved in cell infection. *EMBO J* 14: 2483–2490.
- Mo, Y.Y., Cianciotto, N.P., and Mallavia, L.P. (1995) Molecular cloning of a *Coxiella burnetii* gene encoding a macrophage infectivity potentiator (Mip) analogue. *Microbiol Read Engl* 141 (Pt 11): 2861–2871.
- Müller, W.E.G., and Müller, I.M. (2003) Analysis of the sponge [Porifera] gene repertoire: implications for the evolution of the metazoan body plan. *Prog Mol Subcell Biol* 37: 1–33.
- Muralidharan, K., Stern, A., and Meyer, T.F. (1987) The control mechanism of opacity protein expression in the pathogenic Neisseriae. *Antonie Van Leeuwenhoek* 53: 435–440.
- Neuhaus, E.M., Horstmann, H., Almers, W., Maniak, M., and Soldati, T. (1998) Ethane-freezing/methanol-fixation of cell monolayers: a procedure for improved preservation of structure and antigenicity for light and electron microscopies. *J Struct Biol* 121: 326–342.
- Newsome, A.L., Baker, R.L., Miller, R.D., and Arnold, R.R. (1985) Interactions between *Naegleria fowleri* and *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* 50: 449–452.
- Newton, H.J., Ang, D.K.Y., Driel, I.R. van, and Hartland, E.L. (2010) Molecular pathogenesis of infections caused by *Legionella pneumophila*. *Clin Microbiol Rev* 23: 274–298.

- Nogueira, S.V., Backstedt, B.T., Smith, A.A., Qin, J.-H., Wunder, E.A., Ko, A., and Pal, U. (2013) *Leptospira interrogans* Enolase Is Secreted Extracellularly and Interacts with Plasminogen. *PLoS ONE* **8** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3799732/>. Accessed July 27, 2015.
- Norville, I.H., Breitbach, K., Eske-Pogodda, K., Harmer, N.J., Sarkar-Tyson, M., Titball, R.W., and Steinmetz, I. (2011) A novel FK-506-binding-like protein that lacks peptidyl-prolyl isomerase activity is involved in intracellular infection and in vivo virulence of *Burkholderia pseudomallei*. *Microbiol Read Engl* **157**: 2629–2638.
- Norville, I.H., Harmer, N.J., Harding, S.V., Fischer, G., Keith, K.E., Brown, K.A., *et al.* (2011) A *Burkholderia pseudomallei* Macrophage Infectivity Potentiator-Like Protein Has Rapamycin-Inhibitable Peptidylprolyl Isomerase Activity and Pleiotropic Effects on Virulence ∇ . *Infect Immun* **79**: 4299–4307.
- Nytimes.com; http://www.nytimes.com/2015/08/21/nyregion/health-officials-declare-end-of-legionnaires-outbreak-in-the-bronx.html?_r=1; Erscheinungsdatum 20.08.2015; Abrufdatum 21.09.2015 (Artikel siehe Anhang)
- Ohno, A., Kato, N., Sakamoto, R., Kimura, S., and Yamaguchi, K. (2008) Temperature-dependent parasitic relationship between *Legionella pneumophila* and a free-living amoeba (*Acanthamoeba castellanii*). *Appl Environ Microbiol* **74**: 4585–4588.
- Palusińska-Szyszk, M., and Russa, R. (2009) Chemical structure and biological significance of lipopolysaccharide from *Legionella*. *Recent Patents Anti-Infect Drug Disc* **4**: 96–107.
- Pearlman, E., Jiwa, A.H., Engleberg, N.C., and Eisenstein, B.I. (1988) Growth of *Legionella pneumophila* in a human macrophage-like (U937) cell line. *Microb Pathog* **5**: 87–95.
- Petersen, C., Dirksen, P., and Schulenburg, H. (2015) Why we need more ecology for genetic models such as *C. elegans*. *Trends Genet TIG* **31**: 120–127.
- Politz, S.M., and Philipp, M. (1992) *Caenorhabditis elegans* as a model for parasitic nematodes: a focus on the cuticle. *Parasitol Today Pers Ed* **8**: 6–12.
- Quinn, F.D., and Tompkins, L.S. (1989) Analysis of a cloned sequence of *Legionella pneumophila* encoding a 38 kD metalloprotease possessing haemolytic and cytotoxic activities. *Mol Microbiol* **3**: 797–805.
- Rasch, J. (2011) Expression des Virulenzfaktors ProA und Untersuchung der PPIase-Funktion des Mip-Proteins von *Legionella pneumophila*.
- Rasch, J., Theuerkorn, M., Ünal, C., Heinsohn, N., Tran, S., Fischer, G., *et al.* (2015) Novel Cycloheximide Derivatives Targeting the Moonlighting Protein Mip Exhibit Specific Antimicrobial Activity Against *Legionella pneumophila*. *Front Bioeng Biotechnol* **3**: 41.

- Rasch, J., Unal, C.M., and Steinert, M. (2014) Peptidylprolyl cis-trans isomerases of *Legionella pneumophila*: virulence, moonlighting and novel therapeutic targets. *Biochem Soc Trans* **42**: 1728–1733.
- Rechnitzer, C., Diamant, M., and Pedersen, B.K. (1989) Inhibition of human natural killer cell activity by *Legionella pneumophila* protease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol* **8**: 989–992.
- Riboldi-Tunnicliffe, A., König, B., Jessen, S., Weiss, M.S., Rahfeld, J., Hacker, J., *et al.* (2001) Crystal structure of Mip, a prolylisomerase from *Legionella pneumophila*. *Nat Struct Biol* **8**: 779–783.
- Riddle, D.L., Blumenthal, T., Meyer, B.J., and Priess, J.R. (1997) Introduction to *C. elegans*. In *C. elegans II*. Riddle, D.L., Blumenthal, T., Meyer, B.J., and Priess, J.R. (eds). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20183/>. Accessed January 23, 2015.
- RKI.de (2013); http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2015/13/Art_01.html; Erscheinungsdatum 30.03.15, Abrufdatum 21.09.2015 Epidemiologisches Bulletin 13/2015, Quelle siehe Anhang
- Rodgers, F.G., and Gibson, F.C. (1993) Opsonin-independent adherence and intracellular development of *Legionella pneumophila* within U-937 cells. *Can J Microbiol* **39**: 718–722.
- Rossier, O., Dao, J., and Cianciotto, N.P. (2008) The type II secretion system of *Legionella pneumophila* elaborates two aminopeptidases, as well as a metalloprotease that contributes to differential infection among protozoan hosts. *Appl Environ Microbiol* **74**: 753–761.
- Rowbotham, T.J. (1980) Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J Clin Pathol* **33**: 1179–1183.
- Sadarangani, M., Pollard, A.J., and Gray-Owen, S.D. (2011) Opa proteins and CEACAMs: pathways of immune engagement for pathogenic *Neisseria*. *FEMS Microbiol Rev* **35**: 498–514.
- Sanden, G.N., Morrill, W.E., Fields, B.S., Breiman, R.F., and Barbaree, J.M. (1992) Incubation of water samples containing amoebae improves detection of legionellae by the culture method. *Appl Environ Microbiol* **58**: 2001–2004.
- Schiene-Fischer, C., Aumüller, T., and Fischer, G. (2011) Peptide Bond cis/trans Isomerases: A Biocatalysis Perspective of Conformational Dynamics in Proteins. *Top Curr Chem* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21598101>. Accessed June 9, 2012.
- Schmidt, B., Tradler, T., Rahfeld, J.U., Ludwig, B., Jain, B., Mann, K., *et al.* (1996) A cyclophilin-like peptidyl-prolyl cis/trans isomerase from *Legionella pneumophila*--characterization, molecular cloning and overexpression. *Mol Microbiol* **21**: 1147–1160.

- Shivaji T, Sousa Pinto C, San-Bento A, Oliveira Serra LA, Valente J, Machado J, Marques T, Carvalho L, Nogueira PJ, Nunes B, Vasconcelos P. A large community outbreak of Legionnaires' disease in Vila Franca de Xira, Portugal, October to November 2014. *Euro Surveill.* 2014;**19**(50):pii=20991. Article DOI: <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES2014.19.50.20991>
- Sifri, C.D., Begun, J., and Ausubel, F.M. (2005) The worm has turned--microbial virulence modeled in *Caenorhabditis elegans*. *Trends Microbiol* **13**: 119–127.
- Smith, M.P., Laws, T.R., Atkins, T.P., Oyston, P.C.F., Pomerai, D.I. de, and Titball, R.W. (2002) A liquid-based method for the assessment of bacterial pathogenicity using the nematode *Caenorhabditis elegans*. *FEMS Microbiol Lett* **210**: 181–185.
- Söderberg, M.A., and Cianciotto, N.P. (2008) A *Legionella pneumophila* peptidyl-prolyl cis-trans isomerase present in culture supernatants is necessary for optimal growth at low temperatures. *Appl Environ Microbiol* **74**: 1634–1638.
- Steinert, M., Emödy, L., Amann, R., and Hacker, J. (1997) Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. *Appl Environ Microbiol* **63**: 2047–2053.
- Steinert, M., Hentschel, U., and Hacker, J. (2002) *Legionella pneumophila*: an aquatic microbe goes astray. *FEMS Microbiol Rev* **26**: 149–162.
- Steinert, M., Heuner, K., Buchrieser, C., Albert-Weissenberger, C., and Glöckner, G. (2007) *Legionella* pathogenicity: genome structure, regulatory networks and the host cell response. *Int J Med Microbiol IJMM* **297**: 577–587.
- Stern, A., Brown, M., Nickel, P., and Meyer, T.F. (1986) Opacity genes in *Neisseria gonorrhoeae*: control of phase and antigenic variation. *Cell* **47**: 61–71.
- Stewart, C.R., Burnside, D.M., and Cianciotto, N.P. (2011) The surfactant of *Legionella pneumophila* Is secreted in a TolC-dependent manner and is antagonistic toward other *Legionella* species. *J Bacteriol* **193**: 5971–5984.
- Stewart, C.R., Rossier, O., and Cianciotto, N.P. (2009) Surface translocation by *Legionella pneumophila*: a form of sliding motility that is dependent upon type II protein secretion. *J Bacteriol* **191**: 1537–1546.
- Stone, B.J., and Kwaik, Y. Abu (1998) Expression of multiple pili by *Legionella pneumophila*: identification and characterization of a type IV pilin gene and its role in adherence to mammalian and protozoan cells. *Infect Immun* **66**: 1768–1775.
- Tachado, S.D., Samrakandi, M.M., and Cirillo, J.D. (2008) Non-opsonic phagocytosis of *Legionella pneumophila* by macrophages is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase. *PloS One* **3**: e3324.
- Tan, M.W., Mahajan-Miklos, S., and Ausubel, F.M. (1999) Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas aeruginosa* used to model mammalian bacterial pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 715–720.

- Tan, M.W., Rahme, L.G., Sternberg, J.A., Tompkins, R.G., and Ausubel, F.M. (1999) *Pseudomonas aeruginosa* killing of *Caenorhabditis elegans* used to identify *P. aeruginosa* virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 2408–2413.
- Taylor, M., Ross, K., and Bentham, R. (2009) *Legionella*, protozoa, and biofilms: interactions within complex microbial systems. *Microb Ecol* **58**: 538–547.
- Terada, L.S., Johansen, K.A., Nowbar, S., Vasil, A.I., and Vasil, M.L. (1999) *Pseudomonas aeruginosa* hemolytic phospholipase C suppresses neutrophil respiratory burst activity. *Infect Immun* **67**: 2371–2376.
- Toleman, M., Aho, E., and Virji, M. (2001) Expression of pathogen-like Opa adhesins in commensal *Neisseria*: genetic and functional analysis. *Cell Microbiol* **3**: 33–44.
- Tran, S. (2013) Analyse von Mip-abhängig sezernierten Proteinen aus *Legionella pneumophila* und Charakterisierung von PPIase-Inhibitoren. .
- TrinkwV 2001 Trinkwasserverordnung in der Fassung der Bekanntmachung vom 2. August 2013 (BGBl. I S. 2977), die durch Artikel 4 Absatz 22 des Gesetzes vom 7. August 2013 (BGBl. I S. 3154) geändert worden ist. http://www.gesetze-im-internet.de/bundesrecht/trinkwv_2001/gesamt.pdf.
- Tyson, J.Y., Pearce, M.M., Vargas, P., Bagchi, S., Mulhern, B.J., and Cianciotto, N.P. (2013) Multiple *Legionella pneumophila* Type II secretion substrates, including a novel protein, contribute to differential infection of the amoebae *Acanthamoeba castellanii*, *Hartmannella vermiformis*, and *Naegleria lovaniensis*. *Infect Immun* **81**: 1399–1410.
- Ünal, C.M., and Steinert, M. (2014) Microbial peptidyl-prolyl cis/trans isomerases (PPIases): virulence factors and potential alternative drug targets. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR* **78**: 544–571.
- Ünal, C., Schwedhelm, K.F., Thiele, A., Weiwad, M., Schweimer, K., Frese, F., *et al.* (2011) Collagen IV-derived peptide binds hydrophobic cavity of *Legionella pneumophila* Mip and interferes with bacterial epithelial transmigration. *Cell Microbiol* **13**: 1558–1572.
- Virji, M., Makepeace, K., Ferguson, D.J.P., Achtman, M., and Moxon, E.R. (1993) Meningococcal Opa and Opc proteins: their role in colonization and invasion of human epithelial and endothelial cells. *Mol Microbiol* **10**: 499–510.
- Wagner, C., Khan, A.S., Kamphausen, T., Schmausser, B., Unal, C., Lorenz, U., *et al.* (2007) Collagen binding protein Mip enables *Legionella pneumophila* to transmigrate through a barrier of NCI-H292 lung epithelial cells and extracellular matrix. *Cell Microbiol* **9**: 450–462.
- Weel, J.F., Hopman, C.T., and Putten, J.P. van (1991) In situ expression and localization of *Neisseria gonorrhoeae* opacity proteins in infected epithelial cells: apparent role of Opa proteins in cellular invasion. *J Exp Med* **173**: 1395–1405.

- Wieland, H., Faigle, M., Lang, F., Northoff, H., and Neumeister, B. (2002) Regulation of the *Legionella* mip-promotor during infection of human monocytes. *FEMS Microbiol Lett* **212**: 127–132.
- Wieland, H., Goetz, F., and Neumeister, B. (2004) Phagosomal acidification is not a prerequisite for intracellular multiplication of *Legionella pneumophila* in human monocytes. *J Infect Dis* **189**: 1610–1614.
- Wintermeyer, E., Ludwig, B., Steinert, M., Schmidt, B., Fischer, G., and Hacker, J. (1995) Influence of site specifically altered Mip proteins on intracellular survival of *Legionella pneumophila* in eukaryotic cells. *Infect Immun* **63**: 4576–4583.
- Wintermeyer, E.M. (1994) Molekular- und zellbiologische Untersuchungen zum Einfluss von “Lly” und “Mip” auf die intrazelluläre Vermehrung von *Legionella pneumophila*.
- Wright, E.K., Goodart, S.A., Gowney, J.D., Hadinoto, V., Endrizzi, M.G., Long, E.M., et al. (2003) Naip5 affects host susceptibility to the intracellular pathogen *Legionella pneumophila*. *Curr Biol CB* **13**: 27–36.
- Yang, C.-K., Zhang, X.-Z., Lu, C.-D., and Tai, P.C. (2014) An internal hydrophobic helical domain of *Bacillus subtilis* enolase is essential but not sufficient as a non-cleavable signal for its secretion. *Biochem Biophys Res Commun* **446**: 901–905.
- Yu, V.L., Plouffe, J.F., Pastoris, M.C., Stout, J.E., Schousboe, M., Widmer, A., et al. (2002) Distribution of *Legionella* species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: an international collaborative survey. *J Infect Dis* **186**: 127–128.
- Zemansky, J., Kline, B.C., Woodward, J.J., Leber, J.H., Marquis, H., and Portnoy, D.A. (2009) Development of a mariner-based transposon and identification of *Listeria monocytogenes* determinants, including the peptidyl-prolyl isomerase PrsA2, that contribute to its hemolytic phenotype. *J Bacteriol* **191**: 3950–3964.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
BCYE	Legionellen-Agarmedium (engl. <i>buffered charcoal yeast extract</i>)
°C	Grad Celsius
CFU	Koloniebildende Einheiten (engl. <i>colony forming units</i>)
Cm	Chloramphenicol
d	Tag
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
<i>E. coli</i>	<i>Escherischia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	Fötales Kälberserum (engl. <i>fetal calf serum</i>)
FKBP	FK506-Bindeproteine
g	Erdschwerebeschleunigung ($\sim 9,81 \text{ m/s}^2$)
Gm	Gentamicin
h	Stunde
HLTE	humanes, explantiertes Lungengewebe (engl. <i>human lung tissue explant</i>)
kDa	Kilodalton (1 kDa = 1000 g/mol)
Km	Kanamycin
l	Liter
LB	<i>E. coli</i> Flüssigmedium (engl. <i>lysogeny broth</i>)
LCV	Legionellen-haltiges Phagosom (engl. <i>Legionella-containing vacuole</i>)
LPS	Lipopolysaccharide
mA	Milliampere
MilliQ	vollentsalztes Wasser
min	Minute
Mip	Viulenzfaktor (engl. <i>Macrophage infectivity potentiator</i>)

Mrf	Virulenzfaktor (engl. <i>Mip-dependent replication factor</i>)
ml	Milliliter
MOI	Legionellen/ausgesäte Zelle (engl. <i>multiplicity of infection</i>)
NaOH	Natronlauge
NMR	Kernspinresonanz (engl. <i>nuclear magnetic resonance</i>)
NTA	Nitriloessigsäure
OD	Optische Dichte
OM	Äußere Membran (engl. <i>outer membrane</i>)
OMV	Außenmembranvesikel (engl. <i>outer membrane vesicle</i>)
PBS	Phosphat buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polyethylenglykol
PPIase	Peptidylprolyl <i>cis/trans</i> Isomerase
PpiB	Peptidylprolyl <i>cis/trans</i> Isomerase B
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RT	Raumtemperatur
sek	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
t	Zeit
T1SS	Typ-I-Sekretionssystem
T2SS	Typ-II-Sekretionssystem
T4SS	Typ-IV-Sekretionssystem
Tab.	Tabelle
ü.N.	über Nacht
V	Volt
v/v	Volumenverhältnis
WT	Wildtyp
YEB	Legionellen-Flüssigmedium (engl. <i>yeast extract broth</i>)
µl	Mikroliter

8.2 Tabellen der Sekretomanalyse

Tabelle 15. Im Sekretom der *mip*-Deletionsmutante akkumulierte Proteine, die mit mindestens einer Methode nachgewiesen wurden.

Accession	Locus	Beschreibung	SignalP	Methode
YP001249384.1	ArtJ	Arginine 3rd transport system periplasmic binding protein	nS	1,3
YP001249438.1	AatA	Aspartate aminotransferase A	nS	1,3
YP001249493.1	LpC_0148	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	nS	1,2
YP001249497.1	DapB	4-hydroxy-tetrahydronicotinate reductase	nS	1
YP001249503.1	Pgk	Phosphoglycerate kinase	nS	1
<u>YP001249609.1</u>	<u>LPC_0267</u>	<u>Zinc metalloprotein</u>	<u>Cs</u>	<u>1,3</u>
<u>YP001249613.1</u>	<u>KatG2</u>	<u>Catalase-peroxidase 2 (CP 2)</u>	<u>Cs</u>	<u>1</u>
YP001249654.1	MhpC	Lipolytic enzyme	nS	1
YP001249661.1	LpC_0320	Short chain dehydrogenase	nS	1,2,3
YP001249755.1	ThrS	Threonine--tRNA ligase	nS	1
YP001249786.1	SbpA	Dienelactone hydrolase family protein	nS	1
YP001250013.1	FlgE	Flagellar hook protein FlgE	nS	1
YP001250029.1	SfcA	Malate oxidoreductase	nS	1
YP001250053.1	TrpB	Tryptophan synthase beta chain	nS	1
YP001250089.1	LpC_0766	L-lysine dehydrogenase	nS	1
YP001250090.1	LpC_0767	Piperidine-6-carboxylate dehydrogenase	nS	1,3
YP001250091.1	FadB	3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase oxidoreductase protein	nS	1
YP001250092.1	FadA	3-ketoacyl CoA thiolase	nS	1,2,3
YP001250102.1	GlnA	Glutamine synthetase, type I	nS	1,3
YP001250107.1	HtpG	Chaperone protein HtpG (Heat shock protein HtpG)	nS	1
YP001250117.1	HutU	Urocanate hydratase (Urocanase)	nS	1,3
YP001250120.1	LpC_0798	Dehydrogenase, short chain (Dhs-6C)	nS	1
YP001250133.1	LpC_0811	Uncharacterized protein	nS	1
YP001250159.1	RpsA	30S ribosomal protein S1	nS	1,3
YP001250242.1	LpdA	Dihydrolipoamide dehydrogenase	nS	1
YP001250244.1	LpC_0923	Pyruvate dehydrogenase E1 component	nS	1
YP001250270.1	PrpD	2-methylcitrate dehydratase PrpD	nS	1
YP001250295.1	FadD-1	Long chain fatty acid-CoA ligase	nS	1,2,3
YP001250299.1	OdpA	Pyruvate dehydrogenase E1 alpha subunit	nS	1,3
YP001250300.1	OdpB	Pyruvate dehydrogenase E1 beta subunit	nS	1
YP001250408.1	LpC_1095	Uncharacterized protein	nS	1,2
YP001250469.1	GuaB	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	nS	1
YP001250497.1	IscS	Cysteine desulfurase NifS	nS	1
YP001250522.1	PmbA	Peptide maturation protein PmbA	nS	1
YP001250563.1	LpC_1254	Uncharacterized protein	nS	1,2,3
YP001250578.1	AtoB	Acyl CoA C-acetyltransferase	nS	1
YP001250584.1	AcsA	Acetoacetyl CoA synthetase	nS	1,2
YP001250611.1	Lon	Lon protease	nS	1

YP001250629.1	GloA	Lactoylglutathione lyase	nS	1,3
YP001250637.1	LpC_1337	Lipase	nS	1,3
YP001250667.1	Pfp	6-phosphofructokinase	nS	1,3
YP001250800.1	SahH	Adenosylhomocysteinase	nS	1,3
YP001250801.1	MetK	S-adenosylmethionine synthase	nS	1,3
YP001250802.1	CarA	Carbamoyl-phosphate synthase small chain	nS	1,3
YP001250804.1	DnaK	Chaperone protein DnaK (HSP70)	nS	1,3
YP001250818.1	Eno	Enolase	nS	1,3
<u>YP001250971.1</u>	<u>LpC_1689</u>	<u>TPR repeat protein, protein-protein interaction</u>	<u>Cs</u>	<u>1,2</u>
YP001250997.1	LpC_1715	Uncharacterized protein	nS	1
YP001251027.1	LpC_1745	Glu/Leu/Phe/Val dehydrogenase	nS	1
YP001251052.1	SecB	Protein-export protein SecB	nS	1,3
YP001251062.1	BdhA	3-hydroxybutyrate dehydrogenase	nS	1,3
YP001251366.1	KatG1	Catalase-peroxidase 1	nS	1
YP001251598.1	LpC_2330	Uncharacterized protein	nS	1,3
<u>YP001251599.1</u>	<u>LpC_2331</u>	<u>Uncharacterized protein</u>	<u>Cs</u>	<u>1</u>
YP001251635.1	Ald	Alanine dehydrogenase	nS	1,3
YP001251671.1	MetC	Cystathionine beta-lyase	nS	1
YP001251673.1	DapD	2,3,4,5-tetrahydropyridine-2,6-dicarboxylate N-succinyltransferase	nS	1,3
YP001251683.1	PntA	NAD(P) transhydrogenase subunit alpha	nS	1,3
YP001251744.1	Icd	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	nS	1,3
<u>YP001251821.1</u>	<u>LPC_2560</u>	<u>Opacity protein-like surface antigen</u>	<u>Cs</u>	<u>1</u>
YP001251828.1	GlyA	Serine hydroxymethyltransferase	nS	1
<u>YP001251847.1</u>	<u>LPC_2586</u>	<u>IcmL-like protein</u>	<u>Cs</u>	<u>1</u>
YP001251854.1	Kbl	2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase	nS	1
YP001251867.1	GroL	60 kDa chaperonin	nS	1,2
YP001251909.1	LpC_2649	Uncharacterized protein	nS	1
YP001252016.1	SucD	Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit alpha	nS	1,3
YP001252017.1	SucC	Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta	nS	1,3
YP001252105.1	PurA	Adenylosuccinate synthetase	nS	1
YP001252121.1	AlfI	Fructose biphosphate aldolase	nS	1
YP001252139.1	IcmE	IcmE (DotG)	nS	1,2
YP001252235.1	Ssb	Single-stranded DNA-binding protein	nS	1,2,3
YP001252262.1	Tuf1; tuf2	Elongation factor Tu (EF-Tu)	nS	1
YP001252266.1	RpoC	DNA-directed RNA polymerase subunit beta' (RNAP subunit beta')	nS	1
YP001252267.1	RpoB	DNA-directed RNA polymerase subunit beta (RNAP subunit beta)	nS	1,2
YP001252268.1	RplL	50S ribosomal protein L7/L12	nS	1
YP001252286.1	FolE	GTP cyclohydrolase 1	nS	1
YP001252289.1	Pnp	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase	nS	1,3
YP001252360.1	LpC_3127	Inosine 5'-monophosphate dehydrogenase	nS	1,3
<u>YP001252423.1</u>	<u>LpC_3190</u>	<u>Uncharacterized protein</u>	<u>Cs</u>	<u>1</u>
YP001252499.1	CysK	Cystathionine beta synthase	nS	1,3
YP001252515.1	SodB	Superoxide dismutase	nS	1
YP001252519.1	MaeA	Malate dehydrogenase (NAD-linked), malic enzyme	nS	1
YP001252529.1	AtpD	ATP synthase subunit beta	nS	1,2

YP001252531.1	AtpA2	ATP synthase subunit alpha 2	nS	1,3
YP001251846.1	HutG	Formimidoylglutamase	nS	2
YP001250791.1	Rph	Ribonuclease PH (RNase PH)	nS	2
YP001251691.1	LpC_2424	3-hydroxyisobutyryl Coenzyme A hydrolase	nS	2
YP001250003.1	LpC_0678	Uncharacterized protein	nS	2
YP001250250.1	Ala	D-alanine-aminotransferase	nS	2
YP001252284.1	Ppa	Inorganic pyrophosphatase	nS	2
YP001250608.1	FabI	Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADH]	nS	2,3
<u>YP001250771.1</u>	<u>LpC_1476</u>	<u>Polysaccharide deacetylase</u>	<u>Cs</u>	<u>1,2</u>
YP001251913.1	HslV	ATP-dependent protease subunit HslV	nS	2,3
YP001251100.1	Mdh	Malate dehydrogenase	nS	1
YP001249355.1	LpC_0009	Uncharacterized protein	nS	1,3
YP001251426.1	LpC_2152	Uncharacterized protein	nS	3
<u>YP001251686.1</u>	<u>LpC_2419</u>	<u>Uncharacterized protein</u>	<u>Cs</u>	<u>3</u>
<u>YP001252333.1</u>	<u>LpC_3100</u>	<u>Aminopeptidase</u>	<u>Cs</u>	<u>3</u>
YP001249795.1	LpC_0460	5'-nucleotidase	nS	3
YP001249655.1	GbsA	Glycine betaine aldehyde dehydrogenase	nS	3
YP001250410.1	LpC_1097	Uncharacterized protein	nS	3
YP001250102.1	GlnA	Glutamine synthetase, type I	nS	1,3
YP001249494.1	MmsA	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase	nS	3
YP001250449.1	AstD	N-succinylglutamate 5-semialdehyde dehydrogenase	nS	3
YP001250140.1	LidH	Deoxyribonuclease TatD	nS	3

1: Proteine, die mittels Orbitrap identifiziert wurden.

2: Proteine, die mittels Synapt identifiziert wurden

3: Proteine, die mittels 2D-Gelelektrophorese identifiziert wurden

Tabelle 16. Proteine, die im Sekretom des Wildtyps akkumuliert vorlagen und mit mindestens einer Methode identifiziert wurden.

Accession	Locus	Beschreibung	SignalP	Methode
<u>YP001249436.1</u>	<u>LpC_0090</u>	<u>Uncharacterized protein</u>	<u>Cs</u>	<u>1,2</u>
<u>YP001250192.1</u>	<u>LpC_0870</u>	<u>Phospholipase C</u>	<u>Cs</u>	<u>1</u>
YP001252467.1	PanD	Aspartate 1-decarboxylase	nS	2
YP001251309.1	LpC_2033	Uncharacterized protein	nS	2
YP001251842.1	YjeA	Endo-1,4-beta-xylanase-like protein	nS	2
YP001250077.1	FliD	Flagellar hook associated protein 2 FliD	nS	2
<u>YP001251717.1</u>	<u>Ttg2D</u>	<u>Signal peptide protein, toluene tolerance protein</u> <u>Ttg2D</u>	<u>Cs</u>	<u>2</u>
<u>YP001251584.1</u>	<u>LpC_2316</u>	<u>Ecto-ATP diphosphohydrolase II</u>	<u>Cs</u>	<u>2</u>
YP001249455.1	LpC_0110	Uncharacterized protein	nS	2

1: Proteine, die mittels Orbitrap identifiziert wurden.

2: Proteine, die mittels Synapt identifiziert wurden

3: Proteine, die mittels 2D-Gelelektrophorese identifiziert wurden

Tabelle 17. Proteine, die mittels Orbitrap mindestens zweimal ausschließlich im Sekretom der *mip*-Deletionsmutante nachgewiesen wurden.

Accession	Locus	Beschreibung	SignalP
YP001249351.1	LPC_0005	peptidylarginine deiminase	nS
YP001249352.1	speA	arginine decarboxylase	nS
YP001249444.1	LPC_0099	hypothetical protein	nS
YP001249473.1	LPC_0128	hypothetical protein	nS
YP001249502.1	pykA	pyruvate kinase II	nS
YP001249505.1	tktA	transketolase	nS
YP001249655.1	gbsA	glycine betaine aldehyde dehydrogenase	nS
YP001249705.1	LPC_0364	short chain dehydrogenase/reductase family transporter protein	nS
YP001249719.1	pdxA	4-hydroxythreonine-4-phosphate dehydrogenase	nS
YP001249726.1	orn	oligoribonuclease	nS
YP001249741.1	tgt	queuine/archaeosine tRNA-ribosyltransferase	nS
YP001249770.1	LPC_0435	sugar kinase	nS
YP001249796.1	dotB	organelle trafficking lipoprotein defect DotB	nS
YP001249825.1	phhA	phenylalanine 4-monooxygenase	nS
YP001249838.1	pepA	leucine aminopeptidase	nS
YP001249847.1	carB	carbamoyl phosphate synthase large subunit	nS
YP001249874.1	topA	DNA topoisomerase I	nS
YP001249896.1	LPC_0566	2-oxoisovalerate dehydrogenase E1 component subunits alpha/beta	nS
YP001250034.1	hmgA	homogentisate 1,2-dioxygenase	nS
YP001250118.1	hutH	histidine ammonia-lyase	nS
YP001250123.1	LPC_0801	hypothetical protein	Cs
YP001250134.1	LPC_0812	acyl carrier protein	nS
YP001250155.1	gyrA	DNA gyrase subunit A	nS
YP001250156.1	serC	phosphoserine aminotransferase	nS
YP001250214.1	LPC_0892	aspartyl-tRNA synthetase	nS
YP001250294.1	minC	septum site determining protein MinC	nS
YP001250438.1	putA	bifunctional proline dehydrogenase/pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	nS
YP001250450.1	astB	succinylarginine dihydrolase	nS
YP001250465.1	map	methionine aminopeptidase	nS
YP001250468.1	guaA	GMP synthase	nS
YP001250501.1	clpB	endopeptidase Clp ATP-binding chain B (ClpB)	nS
YP001250564.1	LPC_1255	bifunctional aspartate kinase/diaminopimelate decarboxylase protein	nS
YP001250577.1	LPC_1268	acyl CoA dehydrogenase	nS
YP001250580.1	mccB	propionyl CoA carboxylase subunit beta	nS
YP001250581.1	LPC_1272	enoyl CoA hydratase/isomerase	nS

Accession	Locus	Beschreibung	SignalP
YP001250610.1	LPC_1303	hypothetical protein	nS
YP001250614.1	tig	trigger factor	nS
YP001250651.1	LPC_1351	hypothetical protein	nS
YP001250904.1	LPC_1618	hypothetical protein	nS
YP001250942.1	LPC_1659	ornithine cyclodeaminase	nS
YP001251002.1	LPC_1720	succinate semialdehyde dehydrogenase	nS
YP001251033.1	asnS	asparaginyI-tRNA synthetase	nS
YP001251043.1	hepA	ATP-dependent helicase HepA	nS
YP001251057.1	LPC_1778	hypothetical protein	nS
YP001251168.1	LPC_1890	hypothetical protein	nS
YP001251236.1	LPC_1960	hypothetical protein	nS
YP001251255.1	hss	homospermidine synthase	nS
YP001251261.1	LPC_1985	hypothetical protein	nS
YP001251602.1	LPC_2334	AMP-binding protein	nS
YP001251604.1	tldD	TldD protein	nS
YP001251621.1	ileS	isoleucyl-tRNA synthetase	nS
YP001251654.1	LPC_2386	3-oxoacyl-ACP reductase	nS
YP001251687.1	prfC	peptide chain release factor 3	nS
YP001251691.1	LPC_2424	3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase	nS
YP001251692.1	acdA	short chain-specific acyl CoA dehydrogenase	nS
YP001251853.1	tdh	L-threonine 3-dehydrogenase	nS
YP001251889.1	rpe	D-ribulose-5-phosphate-3-epimerase	nS
YP001251903.1	mao2	malate oxidoreductase	nS
YP001251925.1	LPC_2666	type IV fimbrial biogenesis PilY1-like protein	nS
YP001251953.1	csdB	Selenocysteine lyase	nS
YP001252009.1	LPC_2759	hypothetical protein	nS
YP001252019.1	sucA	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component	nS
YP001252082.1	lpxA	UDP-N-acetylglucosamine acyltransferase	nS
YP001252172.1	edd	phosphogluconate dehydratase	nS
YP001252185.1	LPC_2938	carboxymuconolactone decarboxylase family transporter	nS
YP001252245.1	rplF	50S ribosomal protein L6	nS
YP001252304.1	nuoF	NADH dehydrogenase I subunit F	nS
YP001252351.1	LPC_3118	transcription accessory protein	nS
YP001252359.1	phoH	phosphate starvation inducible protein PhnH	nS
YP001252405.1	LPC_3172	ExsB protein	nS
YP001252471.1	ubiB	CDP-6-deoxy-delta-3,4-glucoseen reductase	nS

Tabelle 18. Proteine, die mittels Orbitrap mindestens zweimal ausschließlich im Sekretom des Wildtyps identifiziert wurden.

Accession	Locus	Beschreibung	SignalP
YP001250132.1	fabD	malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase	nS
YP001250440.1	proQ	ProP osmoprotectant transporter activator ProQ-like protein	nS
YP001251356.1	LPC_2080	secreted peptidase	nS
YP001251681.1	LPC_2414	hypothetical protein	nS
YP001251714.1	murA	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase	nS
<u>YP001251764.1</u>	<u>mip</u>	<u>macrophage infectivity potentiator</u>	<u>Cs</u>
YP001251941.1	LPC_2683	polypeptide deformylase	nS

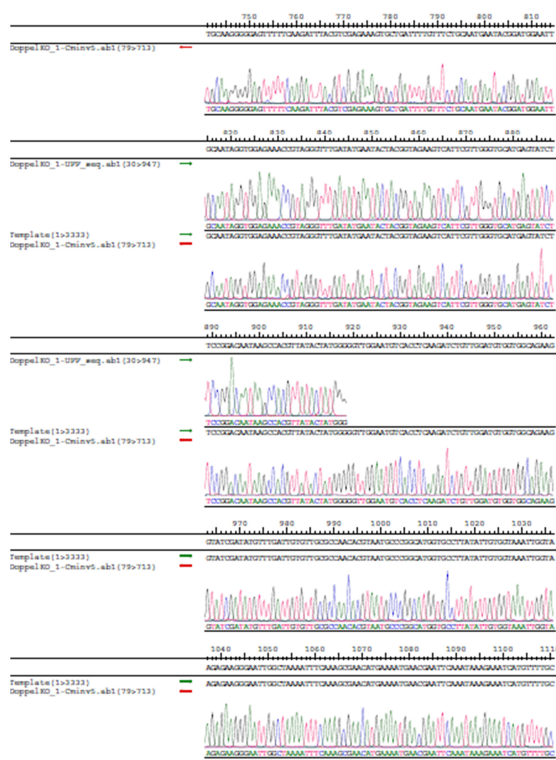
8.3 Alignment der Doppelmutante *ΔmipΔppiB*

Alignment der im Rahmen dieser Arbeit generierten Mutante *ΔmipΔppiB*



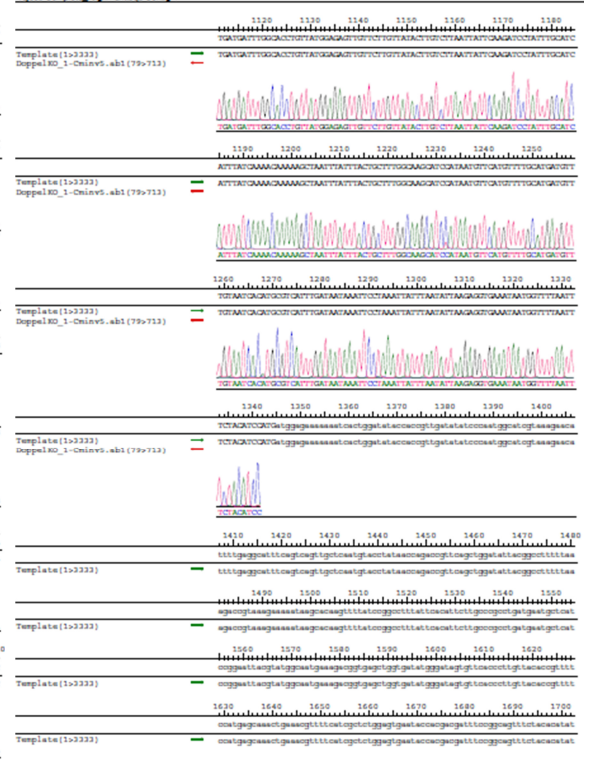
Donnerstag, 16. Januar 2014 11:32
Project: Complete_Alignment.sad Contig 4

Page



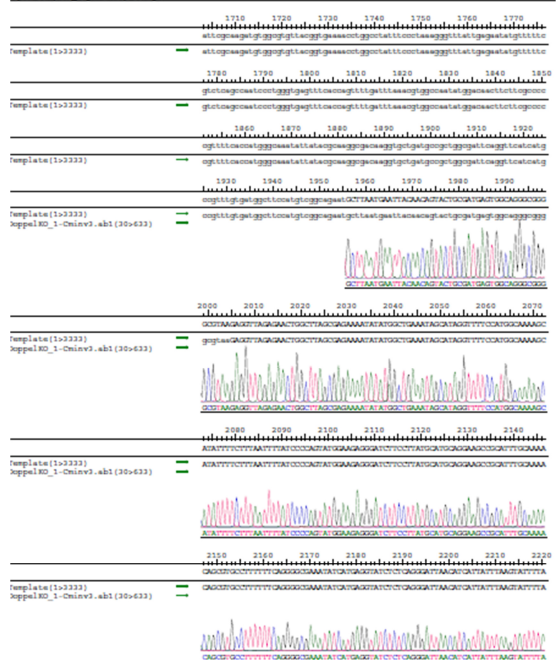
Donnerstag, 16. Januar 2014 11:32
Project: Complete_Alignment.sad Contig 4

Page 4



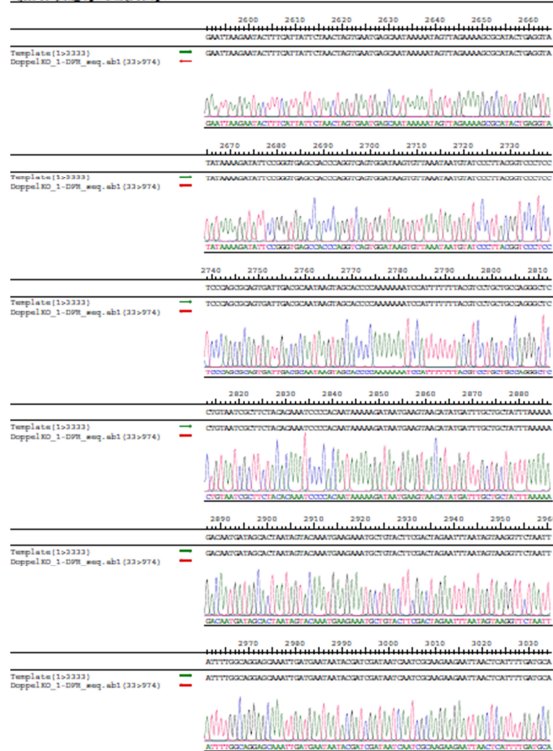
Donnerstag, 16. Januar 2014 11:32
Project: Complete_Alignment.sad Contig 4

Page 5



Donnerstag, 16. Januar 2014 11:32
Project: Complete_Alignment.sgi Contig 4

Page 7



8.4 Internetquellen

Ausbruch Legionärskrankheit in New York im September 2015
(http://www.nytimes.com/2015/08/21/nyregion/health-officials-declare-end-of-legionnaires-outbreak-in-the-bronx.html?_r=1)

N.Y. / REGION

Bronx Legionnaires' Outbreak Is Over, Health Officials Say

By WINNIE HU AUG. 20, 2015

Email

Share

Tweet

Save

More

New York City health officials on Thursday declared an outbreak of Legionnaires' disease in the South Bronx officially over, saying that no new cases had been reported since Aug. 3.

The officials, citing test results, also confirmed they had traced the source of the outbreak to a contaminated cooling tower on top of the [Opera House Hotel](#) on East 149th Street. The finding, which was widely expected, was a blow for the hotel that opened two years ago after a multimillion-dollar renovation of a historic theater building in a poor neighborhood.

The outbreak of Legionnaires' disease — the worst in the city's history — has claimed 12 lives and sickened more than 120 people since early July in the South Bronx, where residents have [asthma](#), [diabetes](#) and other health issues. In response, city health officials ordered this month that every building with a cooling tower had to disinfect it within two weeks of receiving the notice.

The outbreak has also spurred a host of legislative and regulatory efforts intended to prevent similar outbreaks, including a new measure requiring building owners to conduct quarterly inspections of cooling towers.

The hotel's cooling tower was one of five that initially tested positive for the Legionella bacteria. Since then other cooling towers have tested positive, but city health officials have repeatedly said they believe the outbreak started with one or more of the original five cooling towers.

In a statement released Thursday, the Opera House Hotel said that the city's finding was "obviously disappointing."

"It's particularly disappointing because our system is two years old, has the most up-to-date technology available and our maintenance plan has been consistent with the regulations that both the city and the state are putting in place," the statement read.

Hotel officials have previously said that the [tower was cleaned](#) by an in-house engineering department on a regular basis, following industry guidelines. The hotel had also contracted with an outside company, the Metro Group, to perform monthly checks of the chemicals used to help control biological growth in the tower, though those checks did not test for the presence of bacteria.

The hotel, in its statement, noted that it had worked closely with city and state officials, and that tests completed on Wednesday showed that its tower was clear of Legionella. In addition, the hotel pledged to test its cooling tower every 30 days when it is in operation.

Mychal Johnson, 50, a co-founder of South Bronx Unite, an environmental group, said that while the hotel had provided a much-needed service in the South Bronx, he did not understand how its tower had been contaminated with Legionella. "I think we need to carefully find out the facts as to how this state-of-the-art facility — a brand-new facility — could have these issues," he said.

Mr. Johnson added that the outbreak had underscored a larger health issue in the South Bronx, pointing out that many residents had asthma and other respiratory illnesses, which made them more susceptible to Legionnaires' disease. "City agencies came to this community because of the Legionnaires' outbreak, but the epidemic of our high rates of asthma still exists and needs that same attention, if not more," he said.

RELATED COVERAGE



Order to Clean Towers Strains Crews Amid Legionnaires' Outbreak in Bronx AUG. 16, 2015




Hotel That Enlivened the Bronx Is Now a 'Hot Spot' for Legionnaires' AUG. 10, 2015




New York Council Passes Bill Aimed at Limiting Future Legionnaires' Outbreaks AUG. 13, 2015

Ausbruch Legionärskrankheit in Warstein im August 2013 (http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2015/13/Art_01.html)



ROBERT KOCH INSTITUT

Kontakt | Inhalt | Hilfe | Impressum

 Gebärdensprache

Institut

Gesundheitsmonitoring

Infektionsschutz

Forschung

Startseite > Infektionsschutz > Epidemiologisches Bulletin > Legionärskrankheit in Deutschland (2001 bis 2013)

Epidemiologisches Bulletin

Legionärskrankheit in Deutschland (2001 bis 2013)

Seit Einführung der Meldepflicht für die Legionärskrankheit im Jahr 2001 wurden am [RKI](#) bis zum Jahr 2013 (Stichtag: 1. März 2014) insgesamt 6.675 Fälle registriert. Im Jahr 2013 belief sich die Zahl auf 922 Fälle. Gegenüber dem Vorjahr (654 Fälle) kam es zu einem deutlichen Anstieg der registrierten Fallzahlen, was zu einem großen Teil auf ein Ausbruchsgeschehen mit insgesamt 159 Fällen im August 2013 im Raum Warstein (NRW) zurückzuführen war. Eine detaillierte Auswertung der Meldedaten ist im Epidemiologischen Bulletin 13/2015 erschienen, u. a. mit Angaben zu Altersverteilung, möglichen Infektionsquellen, Diagnostik und Letalität. Die im Rahmen der Meldepflicht erfassten Fälle repräsentieren nur einen Bruchteil der tatsächlichen Erkrankungen. Es ist von einer erheblichen Untererfassung auszugehen, da bei einer Pneumonie nicht immer eine spezifische Legionellen-Diagnostik veranlasst wird und das klinische Bild allein keine Rückschlüsse auf den ursächlichen Erreger der Pneumonie zulässt. Nach Schätzungen des Kompetenznetzwerkes für ambulant erworbene Pneumonien geht man für Deutschland von jährlich etwa 15.000 bis 30.000 Erkrankungen aus. Das Problem der Untererfassung ist aber auch aus anderen europäischen Ländern bekannt.

Veröffentlicht: [Epidemiologisches Bulletin 13/2015](#) (PDF, 469KB, Datei ist nicht barrierefrei)

Stand: 30.03.2015